

Mutagenitätsuntersuchungen
von Coffein und 3,4-Benz(a)pyren
mit Hilfe der SCE-Methode in vivo

Ursula Bachmann

Düsseldorf 1978

1979

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. G. RÖHRBORN)

Mutagenitätsuntersuchungen von Coffein und
3,4-Benz(a)pyren mit Hilfe der SCE-Methode
in vivo

D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von
Ursula Bachmann

1978

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.:
Prof. Dr. Reinauer

Referent
gez.:
Prof. Dr. Röhrborn

Korreferent
gez.:
Prof. Dr. Ohnesorge

Meinen Eltern
und
meiner Schwester
gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533917_0097

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Die Entwicklung der SCE - Methode	1
1.2 Testsubstanzen	6
1.2.1 Zur mutagenen Wirkung von 3,4-Benz(a)pyren	6
1.2.2 Zur mutagenen Wirkung von Coffein	8
1.3 Problemstellung	11
2. Testsubstanzen, Material und Methoden	12
2.1 Chemie und Pharmakologie der Testsubstanzen	12
2.1.1 Coffein	12
2.1.2 3,4-Benz(a)pyren	16
2.2 Material	19
2.2.1 Chemikalien	19
2.2.2 Tiere	19
2.3 Methoden	21
2.3.1 Knochenmark	21
2.3.2 SCE	25
2.3.3 Kriterien der Auswertung	28
3. Ergebnisse	31
4. Diskussion	48
5. Zusammenfassung	54
6. Literaturverzeichnis	55



1. EINLEITUNG

1.1 Die Entwicklung der SCE-Methode

Zur Untersuchung der Induktion von Chromosomenaberrationen am Säuger in vivo bediente man sich bis vor einiger Zeit vor allem der cytogenetischen Testverfahren, bei denen die Chromosomendarstellung aus dem Knochenmark, den Oocyten, den Spermatogonien oder aus der Fibroblastenkultur erfolgte. Bei der Auswertung der Präparate achtete man dann auf numerische Aberrationen (polyploide und aneuploide Metaphasen) und strukturelle Aberrationen (Gap, Bruch, Fragment, Deletion, Exchange).

Zu den bekannten Testverfahren ist in jüngerer Zeit ein weiteres Mutagenitätstestsystem hinzugekommen, die Analyse von induzierten Schwesterchromatidaustauschen (SCE - sister chromatid exchange) im in vivo Verfahren. Dieses in vivo Testsystem wurde aus einem in vitro Verfahren entwickelt, welches erstmals 1958 von TAYLOR durchgeführt wurde. Er beobachtete den Schwesterchromatidaustausch an Chromosomen, die er aus den Wurzeln der Knolle von *Bellevalia romana* präpariert hatte. Die Zellen kultivierte er in einem Medium, das H³ Thymidin enthielt. Sobald sich die 1. Teilung dieser Zellen vollzogen hatte, wechselte er das Medium, so daß die 2. Reduplikation in einem normalen Medium stattfand. Nach dem WATSON und CRICK-Modell besteht die DNA aus 2 Strängen. Bei der 1. Reduplikation erhält nun nach TAYLOR jeder Originalstrang der DNA einen neuen, markierten Strang. Das hat bei der autoradiographischen Darstellung zur Folge, daß beide Tochterchromosomen markiert sind. Bei der 2. Reduplikation, die in einem Medium stattfand, welches kein Tritium-markiertes Thymidin enthielt, bildeten

ein markierter Strang und ein neuer, unmarkierter Strang ein Tochterchromosom. Das andere Tochterchromosom wurde von dem unmarkierten Strang und dem neu gebildeten, unmarkierten Strang gebildet. Jetzt waren bei der autoradiographischen Darstellung ein markiertes und ein unmarkiertes Tochterchromosom zu sehen. Aufgrund der unterschiedlichen Darstellung der Chromosomen konnte man nun den reziproken Austausch von Segmenten, nämlich den Schwesterchromatidaustausch, beobachten. TAYLOR meint, daß die Austausche rein mechanisch mit einem crossing-over verglichen werden könnten.

1973 gelang es S. A. LATT die beiden Chromatiden mit dem Fluoreszenzfarbstoff 33258 von Hoechst unterschiedlich zu färben, so daß Austausche auch ohne Autoradiographie gut sichtbar waren. Er fand, daß der Farbstoff fluoreszierte, wenn er sich an poly (dA-dT) band. Wenn sich die Zellen in einem Medium replizierten, das BUDR (5-bromodeoxyuridine) enthielt, so wurde anstelle von Thymidin (T) BUDR in die DNA eingebaut. Band sich jetzt der Farbstoff an poly (dA-BUDR) fluoreszierte er nicht mehr. Wenn sich die Zellen in einem BUDR enthaltenden Medium zweimal replizierten, so waren in einem Chromatid beide Stränge substituiert, in dem anderen Chromatid war nur in einem Strang Thymidin durch BUDR ersetzt. Beide Chromatiden fluoreszierten zwar, aber das zweisträngig substituierte Chromosom fluoreszierte nicht so leuchtend wie das einsträngig substituierte. Diese Methode hatte nur den Nachteil, daß der Farbstoff ein erhebliches Maß an Photoinstabilität zeigte, so daß das Bild sehr schnell verblaßte.

1974 erfanden PERRY und WOLFF eine haltbare unterschiedliche Färbung der beiden Schwesterchromatiden (FPG - Methode = Fluoreszenz plus Giemsa). Sie gingen

ähnlich vor wie LATT, nur daß sie die Präparate nach der Färbung 24 Stunden altern ließen und dann für 2 Stunden bei 60° C entweder in 2x SSC (0,3 M sodium chlorid - 0,03 M trisodium citrate) oder Wasser inkubierten. Dann wurden die Präparate 30 Minuten in 3% Giemsa-Lösung gefärbt. Diese Färbung war nun haltbar. Das Chromatid, welches in beiden Strängen BUDR enthielt, fluoreszierte nur schwach und färbte sich nun auch nur schwach mit Giemsa. Das Chromatid, welches BUDR in nur einem Strang enthielt, fluoreszierte leuchtend und färbte sich nun dunkel mit Giemsa. Genau wie IKUSHIMA und WOLFF (1974) sind PERRY und WOLFF der Meinung, daß der Unterschied zwischen den beiden Chromatiden nicht durch unterschiedliches Unterdrücken der Fluoreszenz hervorgerufen wird. Sie nehmen an, daß das inkorporierte BUDR einen physiko-chemischen Prozeß in der DNA hervorruft, der die Synthese oder die Bindung von Proteinen verhindert, die für die Chromosomenkondensation verantwortlich sind. Somit wären die Unterschiede durch eine unterschiedliche Chromosomenspiralisation hervorgerufen.

Nun war erstmals eine leicht anwendbare Methode zum Nachweis induzierter Schwesterchromatidaustausche entwickelt worden. Hierbei handelte es sich jedoch immer noch um ein in vitro Testsystem.

Einen ersten Versuch SCEs in vivo zu induzieren, machten 1975 S. BLOOM und T. C. HSU. Sie arbeiteten mit Hühnerembryonen. Sie fanden, daß man unterschiedliche Fluoreszenz der Schwesterchromatiden beobachten konnte, wenn man 3-Tage-Hühnerembryonen für 26 Stunden lang BUDR ins Ei injizierte und dann die präparierten, luftgetrockneten Chromosomen mit dem 33258 Höchstfarbstoff färbte.

Der eigentliche Durchbruch gelang dann aber VOGEL und BAUKNECHT 1976, die den in vivo Versuch mit Mäusen durchführten und die Chromosomen aus dem Knochenmark präparierten. Sie spritzten den Tieren FUDR (5-fluorodeoxyuridine). Dieser Stoff verhindert die Synthese von Thymin in der Leber. Des weiteren wurde den Tieren BUDR injiziert. Anstelle des natürlich vorkommenden Thymidins wurde nun BUDR in die Chromosomen eingebaut (s. Abb. 1, S. 5). Mit Hilfe bestimmter Färbetechniken (s. u. Material und Methode) war es nun möglich, die Schwesterchromatidaustausche in vivo darzustellen.

Unabhängig von VOGEL und BAUKNECHT entwickelten ALLEN und LATT ebenfalls 1976 eine Methode, um SCEs in vivo an Spermatogonien der Maus nachzuweisen.

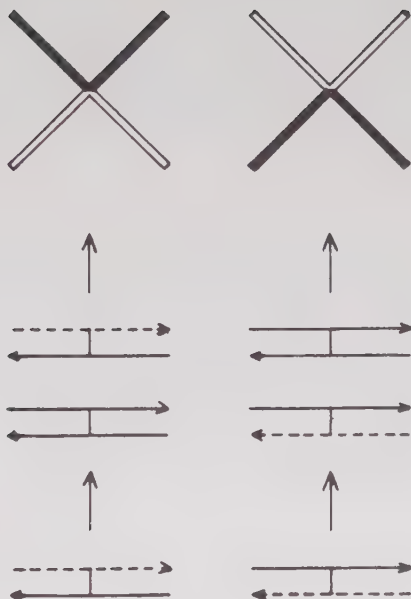
Das in vivo Verfahren brachte folgende grundlegende Vorteile gegenüber den in vitro Testsystemen:

1. die zu testenden Substanzen können vom Säugetier, mit dem getestet wird, metabolisiert werden
2. Dosiseffektbeziehungen in Korrelation zum Menschen sind möglich
3. verschiedene Formen der Applikation (oral, intra-peritoneal, subcutan u. a.) sind machbar

Aus ersten Untersuchungen (BAYER und BAUKNECHT, 1976, BAUKNECHT, VOGEL, BAYER und WILD, 1977) kann vermutet werden, daß die SCE-Methode empfindlicher ist als die klassischen cytogenetischen Methoden. Nach SAVAGE (1975) kann die Induktion von SCEs als ein Zeichen für Mutagenität angesehen werden, und daher wird dieses Testsystem in Zukunft zu den in vivo Studien gehören. Jedoch könnte die höhere Sensibilität der SCE-Methode auf bestimmte Substanzen beschränkt sein, so daß man dieses Verfahren zunächst nicht ohne entsprechende cytogenetische Untersuchungen anwenden sollte.

2. Metaphase

Duplikation ohne BUDR



1. Teilung

Duplikation mit BUDR

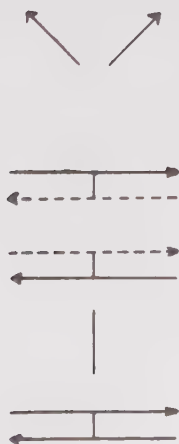


Abb.1: Die Zeichnung zeigt das Ergebnis des Einbaus von BUDR.
Die gestrichelten Linien stellen den markierten Strang dar.

1.2 TESTSUBSTANZEN

1.2.1 Zur mutagenen Wirkung von 3,4-Benz(a)pyren

Über die mutagene Wirkung von 3,4-Benz(a)pyren finden sich relativ wenig Hinweise in der Literatur. 1968 wiesen S. S. EPSTEIN und H. SHAFNER unter anderem die Mutagenität von 3,4-Benz(a)pyren im Dominant-Letal-Test der Maus nach.

1973 testeten B. N. AMES et al. 18 Carcinogene, darunter auch 3,4-Benz(a)pyren, auf ihre mutagene Wirkung. An Bakterien (*Salmonella histidine mutants*) wiesen sie nach, daß sehr viele starke Carcinogene Mutationen eines besonderen Typs hervorrufen, nämlich Punktmutationen. Sie nahmen an, daß die Carcinogene, die auch mutagen sind, ein Carcinom durch eine somatische Mutation hervorrufen. Dieser Gedanke war allerdings nicht neu (BOVERI, 1914, BAUER, 1949, RIEGER, 1963).

1975 wiesen J. McCANN, N. E. SPINGARN, KOBORI und B. N. AMES wiederum die Mutagenität von einigen Carcinogenen nach. Sie hatten ihr Untersuchungssystem aber insofern weiterentwickelt, daß sie nun 2 neue Bakterienstämme hatten, die wesentlich sensibler waren. Auch hier erwies sich 3,4-Benz(a)pyren als mutagen.

1975 testeten J. McCANN et al. in einer großen Studie ca. 300 Carcinogene und Nicht-Carcinogene. Sie fanden, daß 90% der Carcinogene, darunter auch 3,4-Benz(a)pyren, mutagen waren; sogar einige Nicht-Carcinogene erwiesen sich als mutagen.

Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen mit dem Punktmutationssystem liegen auch wenige Untersuchungen über die Auslösung von Chromosomenaberrationen in vivo vor. So untersuchten BASLER und RÜHRBORN 1976 die Mutagenität von 3,4-Benz(a)pyren an Mäusen und chin. Hamstern. Bei beiden Tierspecies ließ sich an den Chromosomen, die einmal aus den Oocyten der Maus, zum anderen aus Zellen des Knochenmarks gewonnen waren, eine erhöhte Aberrationsrate nachweisen.

Ebenfalls 1976 testeten BAYER und BAUKNECHT 3 Kohlenwasserstoffe mit der SCE-Methode. Im Einklang mit ihrem carcinogenen Effekt verursachten 7,12-Dimethylbenzantracen und 3,4-Benz(a)pyren Schwesterchromatidaustausche in vivo im Knochenmark des chin. Hamsters. Die Stoffe zeigten eine dosisabhängige Induktion von SCEs. Phenantren war inaktiv.

1977 untersuchten S. TAKEHISA und S. WOLFF in Zellkulturen von chin. Hamstern die Induktion von SCEs nach Gabe von carcinogenen Mutagenen, die aber metabolische Aktivierung erforderten. Ohne Aktivierung erhöhte 3,4-Benz(a)pyren die SCE Frequenz nur schwach; nach Aktivierung ergab sich jedoch ein starker Anstieg der SCEs.

1.2.2 Zur mutagenen Wirkung von Coffein

FRIES und KIHLMAN (1948) zählen mit zu den ersten Autoren, die sich mit der Mutagenität von Coffein befaßten. 1949 wiesen KIHLMAN und LEVAN strukturelle Chromosomenveränderungen an Pflanzenzellen nach Einwirkung von Coffein nach.

Auch an Bakterien wurden zahlreiche Untersuchungen gemacht. Hier wären DELVAUX und DEVORET (1969) und HARM (1967) zu nennen. DELVAUX und DEVORET fanden die Grenze der absoluten Wachstumshemmung bei einem Stamm von *E. coli* bei 0,35% Coffein. Aus Subkulturen, die im Grenzbereich der tödlichen Coffeindosis wuchsen, erhielten sie coffeinresistente Stämme. HARM (1967 und 1970) fand in Übereinstimmung mit anderen Autoren, daß die Coffeinwirkung reversibel ist und postulierte, daß "caffeine might inhibit dark repair by competing with the repair enzymes for the sites of lethal or mutagenic UV-photoproducts" (HARM, 1970).

NAGAI (1962) fand an Hefekulturen, daß in Anwesenheit von Coffein die Mutantenhäufigkeit unterdrückt war.

Bei den Untersuchungen an Pilzen (*Ophiostoma multiannulatum*) waren die Aussagen unterschiedlich. FRIES (1950) fand zwischen den Mutantenstämmen, die er einmal durch UV-Bestrahlung, zum anderen durch verschiedene Coffeinbehandlungen erhalten hatte, keinen Unterschied. Diese Tatsache führte er auf eine mutagene Wirkung von Coffein zurück. ZETTERBERG (1960) dagegen fand keinen Hinweis auf Mutagenität von Coffein in seinen Experimenten. Die negativen Ergebnisse könnten seiner Meinung nach aber auf eine zu kurze Behandlungsdauer zurückzuführen sein.

Die Versuche an Zellkulturen liefern insofern wichtige Aussagen, als daß man hierbei Kulturen

von Zellen höherer Tiere, sogar von menschlichen Zellen, anlegen kann. HARTLEY-ASP und KIHLMAN fanden 1971, daß die Rate der Chromosomenaberrationen an chin. Hamsterzellen nach einer Mitomycin C Behandlung wesentlich höher war, wenn man die Zellen zusätzlich noch mit Coffein behandelte. Einen ähnlichen Effekt fanden KIHLMAN et al. 1973, als sie Pflanzenzellen (*Vicia faba*) und Zellen von chin. Hamstern mit verschiedenen physikalischen und chem. Agenzien behandelten. Bei einer gleichzeitigen Behandlung mit Coffein erhöhte sich die Chromosomenaberrationsrate mehr als bei einer Behandlung ohne Coffein. Sie erklärten das damit, daß an der Stelle der Schädigung der DNA eine Lücke (gap) entsteht, und Coffein es verhindert, daß diese Stelle geschlossen wird. "Thus gaps accumulate in the presence of caffeine, provided that DNA replication goes on." (KIHLMAN et al., 1973)

OSTERTAG (1965, 1966) arbeitete mit Kulturen von Leukozyten und Hela-Zellen. Er fand eine Erhöhung der Bruchhäufigkeit nach Coffeineinwirkung. Außerdem zeigten sich starke morphologische Veränderungen an den Zellen. Der Zellkern fragmentierte und es kam zur Ausstoßung von Chromosomen.

Weit wichtiger als Aussagen über Versuche an Zellkulturen sind Aussagen bei Ganztiierversuchen. Bei *Drosophila* sind die Ergebnisse widersprüchlich. MITTLER et al. (1967) fanden nach Coffeineinwirkung bei männlichen Fliegen eine erhöhte Rate von Chromosomenbrüchen, bei weiblichen Tieren kam es zur Nondisjunction. ALDERSON und KHAN (1967) dagegen fanden keine Anzeichen für Coffeinmutagenität bei *Drosophila*, denn bei Larvenaufzucht in Coffeinnährböden zeigten sich keine Letalmutationen in der F_2 oder F_3 .

Die Ergebnisse mit Versuchen an Mäusen sind negativ. ADLER und RÜHRBORN (1969) behandelten männliche C3H Mäuse und männliche F_1 Hybriden über lange Zeit mit verschiedenen Coffeindosen. Darunter auch mit einer geringen Dosis, die etwa mit der 4 fachen Menge, wie sie am Menschen üblich ist, zu vergleichen war. In einer von 5 Versuchsserien wurde eine signifikante Erhöhung in der Häufigkeit von univalenten Chromosomen gefunden, die aber von den Autoren selbst als Zufallsergebnis gewertet wurde.

Auch die Untersuchung von RÜHRBORN 1972 verlief negativ. Er behandelte männliche C3H Mäuse und F_1 Hybriden über lange Zeit mit niedrigen Coffeindosen, also Dosen, die auch beim Menschen auftreten können. Als Kriterium für dominante Letalmutationen diente der Anstieg der Rate der prä- und postimplantativen Eiverluste. Es zeigte sich jedoch keine Erhöhung.

In der Arbeit von EPSTEIN (1970) finden sich auch keine Hinweise für eine Mutagenität von Coffein. Im Dominant-Letal-Test der Maus zeigte sich weder bei der alleinigen Gabe von Coffein ein Hinweis auf Mutagenität noch bei der gleichzeitigen Gabe von Coffein und bekannten Mutagenen.

Auch an chin. Hamstern konnte keine mutagene Wirkung von Coffein gezeigt werden (RÜHRBORN und BUCKEL, 1976). Jedoch erhöhte sich die Rate der Chromosomenaberrationen nach simultaner Applikation von Cyclophosphamid und Coffein.

Bei den Versuchen mit Ratten wäre die Arbeit von G. BACHMANN (1946) zu erwähnen. Er behandelte Ratten über längere Zeit mit Coffeindosen von 40 - 50 mg/kg.

Die Rate der Nachkommen war nicht erniedrigt, und die Histologie des Hodens war bei 57% der Versuchstiere und 53% der Kontrolltiere normal.

Es gibt auch einige Versuche mit Coffein an Kaninchen und Hunden. Jedoch wurden bei diesen Untersuchungen meist so hohe Dosen von Coffein genommen, daß aufgrund der toxischen Dosis Veränderungen auftraten.

Um eine mögliche mutagene Wirkung von Coffein im Kaffee beim Menschen nachzuweisen, untersuchten 1966 in einer großangelegten Studie VOGEL, KRÜGER, KURTH und SCHROEDER die Beziehung zwischen dem Kaffeegenuß der Eltern und dem Geschlechtsverhältnis unter ihren Kindern. Jedoch ließ sich kein Zusammenhang zwischen Coffein-Aufnahme und Geschlechtsverhältnis darstellen.

1.3 Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit sollen nun 2 Stoffe mit Hilfe der SCE-Methode getestet werden, und zwar Coffein und 3,4-Benz(a)pyren. Zum einen soll eine mögliche mutagene Wirkung von Coffein untersucht werden, zum anderen der Einfluß von Coffein auf die SCE Rate nach Applikation des Mutagens 3,4-Benz(a)pyren. BENEDIGKEIT und HANAWALT (1968) konnten an E. coli nachweisen, daß Coffein den Reparationsmechanismus verhindert. Da die SCE-Stellen an den Chromosomen diejenigen sind, an denen eine Reparatur stattgefunden hat (BENDER, 1974), müßte bei der simultanen Applikation von Coffein und 3,4-Benz(a)pyren eine Verminderung der SCE Frequenz im Gegensatz zur

alleinigen Applikation von 3,4-Benz(a)pyren festgestellt werden. Diese Hypothese soll in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden.

2. TESTSUBSTANZEN, MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemie und Pharmakologie der Testsubstanzen

2.1.1 Coffein

1820 gelang es dem Chemiker F. RUNGE das Alkaloid Coffein aus Kaffeebohnen zu extrahieren. Coffein ist ein farb- und geruchloses, leicht bitter schmeckendes Pulver. Seiner Zusammensetzung nach ist es nahe verwandt mit den Alkaloiden Theophyllin und Theobromin, sowie Xanthin und Harnsäure. Diese Xanthinderivate lassen sich alle vom Purin $C_5H_4N_4$ ableiten.

Coffein ist ein 1,3,7-Trimethylxanthin (s. Abb. 2). Es sublimiert bei $180^{\circ} C$ und schmilzt (unter Druck) bei $236,5^{\circ} C$. Coffein ist in Wasser schwer löslich (1:50), am besten in Chloroform (1:6).

Der Biosyntheseweg des Coffeins in der Kaffeepflanze verläuft so, daß es wahrscheinlich aus Purinen gebildet wird, die aus Abbauprodukten der Nukleinsäuren entstehen. Heute ist man auch in der Lage, Coffein auf synthetischem Wege herzustellen (BREDERECK et al., 1959).

Coffein (auch Tein genannt) ist außer in Kaffeebohnen noch in Teeblättern, der Colanuß, der Guarana, im Paraguaytee und einigen anderen Pflanzen enthalten. Am häufigsten wird es aber wohl in Form des Kaffeetränkes zu sich genommen. Für einen Kaffeeaufguß mittlerer Stärke nimmt man in Deutschland 7,5 g/150 ml Wasser. Der Coffeingehalt bei einem Normalaufguß beträgt 80 mg/Tasse. Dabei sind 90% des

Coffeins ins Getränk übergegangen. Die Aufnahme des Coffeins geschieht also durch den Magen-Darm-Kanal. Nach AXELROD und REICHENTHAL (1953) findet man das Maximum der Plasmakonzentration schon nach ca. 1 Stunde. Sie untersuchten auch die Konzentration im Gewebe. Diese ist jedoch in Erythrocyten, Leber, Lunge, Herz, Muskel, Niere, Milz und Gehirn genauso hoch wie die Konzentration im Plasma, wenn man auf den Wassergehalt der Organe bezieht. Bei der Resorption von Coffein spielt die Komplexbildung eine Rolle. Manche Stoffe bilden mit Coffein Komplexe, so daß die Resorption von beiden geringer ist. Dies zeigten BATES et al. (1970) an künstlichen Membranen. In Form von Kaffee wird Coffein nur langsam resorbiert, wie CZOK, SCHMIDT und LANG 1969 am Versuch mit Ratten zeigten.

Die Eliminationsrate beträgt 12-22% / Stunde wie AXELROD und REICHENTHAL (1953) in Versuchen mit 12 männlichen Personen errechneten. Dem entspricht eine Halbwertszeit von 3,5 Stunden. Beim Abbau des Coffeins wird der größte Teil im Körper zersetzt. 2% werden unverändert im Urin ausgeschieden, der Rest erscheint als Monomethylxanthin und Xanthin im Harn (s. Tab. 1 und Abb. 3).

Zu den Symptomen, die sich im Tierversuch bei zu hoher Dosierung zeigten, zählt eine stark gesteigerte motorische Aktivität. Die minimale toxische Dosis von Coffein liegt beim Menschen bei 2-5 mg / kg (ULRICH, 1958). Bei empfindlichen Personen kann die Dosis sogar noch niedriger sein. Ausgesprochene Suchtfälle sind in der Literatur nur sehr wenige beschrieben. Auch über Todesfälle nach zu hoher Coffeindosis wird wenig berichtet.

Ausgeschiedene Verbindung

7 Methylxanthin	30	40
1 Methylharnsäure	254	301
1,3 Dimethylharnsäure	142	46
Coffein	11	12
1 Methylxanthin	74	19
1,7 Dimethylxanthin	<u>74</u>	<u>19</u>
	753	620

Tab. 1: Übersicht über die Ausscheidung von Methylxanthinen und Methylharnsäuren in den ersten 24 Stunden nach Gabe von je 1 g Coffein an 2 Versuchspers.

Zahlen in mg.

(aus: EICHLER, O., 1976, verändert)

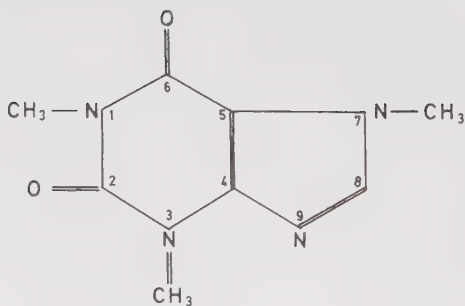


Abb. 2: Coffein

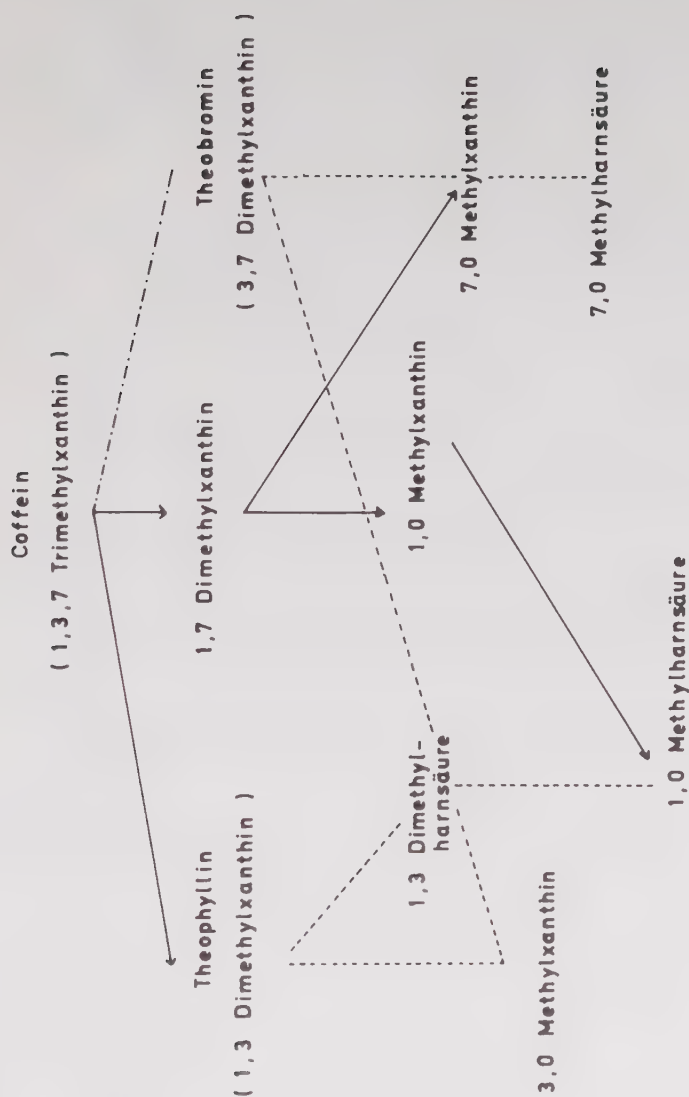


Abb. 3: Stoffwechselwege von Coffein (—), Theophyllin und Theobromin (---) beim Menschen (aus: EICHLER 1976, S.333)

2.1.2 3,4-Benz(a)pyren (im folgenden kurz als Benzpyren oder 3,4-Benzpyren bezeichnet)

3,4-Benzpyren zählt zu den polyzyklischen, aromatischen Kohlenwasserstoffen, die bekanntlich die wichtigste Gruppe krebserzeugender Stoffe bilden. Die Gruppe umfaßt ca. 200 aktive Verbindungen. Die stärksten Kanzerogene sind z. Bsp. das 9,12-Dimethyl-1,2-benzanthracen, das 20-Methylcholanthren und auch das 3,4-Benzpyren. Unter geeigneten Bedingungen können diese Stoffe im Tierversuch schon mit wenigen Mikrogramm Krebs auslösen. Sie wirken primär am Ort der Verabfolgung, so daß sich überwiegend Haut-, Bronchial- und Magenkrebs ergeben.

3,4-Benzpyren wurde erstmals von HIEGER 1918 aus Steinkohlenteer isoliert. Die Summenformel lautet $C_{20}H_{12}$, sein Molekulargewicht beträgt 252,3 (s. Abb. 4). Makroskopisch erscheint Benzpyren als gelbliche Plättchen oder Nadeln, die bei 250° C und 3-4 mm Druck sublimieren. Benzpyren ist in aromatischen Lösungsmitteln löslich (in Benzol mit violetter Fluoreszenz), in Alkoholen weniger löslich. Der Nachweis von Benzpyren geschieht mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie. Durch Bestimmung der Fluoreszenzintensität läßt sich Benzpyren auch noch in geringen Dosen nachweisen.

Es kommt praktisch überall in der Umwelt vor. Beim Rauchen entstehen geringe Spuren von Benzpyren, die vielleicht die Ursache des bei Rauchern gehäuft auftretenden Lungenkarzinoms sind.

Eine weitere Quelle des 3,4-Benzpyrens sind nach SHABAD (1967) die Auspuffgase der Kraftfahrzeuge. Er weist auf ZABEZHINSKY (1966) hin, der in Leningrad Untersuchungen über die 3,4-Benzpyren - Konzentration

in der Luft einer vielbefahrenen Straße machte und dabei feststellte, daß an benachbarten Plätzen, wo kein starker Kraftfahrzeugverkehr herrschte, die Benzpyrenkonzentration 2 - 4 fach niedriger war.

Aber auch die Anlagen der Industrie- und Haushaltsfeuerungen dürfen als Emissionsquellen für Benzpyren nicht übersehen werden.

Nach KNORR (1957) enthalten sogar Naturprodukte wie Kohle und Erdöl polyzyklische Kohlenwasserstoffe.

Auch unsere Nahrungsmittel enthalten einen beträchtlichen Anteil an 3,4-Benzpyren. SCHMIDT (1969) untersuchte eine große Anzahl von Nahrungsmittel auf ihren Gehalt an Benzpyren und konnte es nachweisen in praktisch allen untersuchten Nahrungsmitteln pflanzlichen Ursprungs, nicht jedoch primär in den untersuchten tierischen Produkten. Durch Erhitzen oder Backen unter küchenmäßigen Bedingungen wird der primäre Kanzerogengehalt nicht wesentlich verändert. Der Benzpyreng Gehalt von Räucherwaren ist nur unter extremen Bedingungen deutlich höher als der Primärgehalt pflanzlicher Produkte ohne Verarbeitung. Weiterhin stellte er fest, daß die gleichzeitig vorhandenen Lösungsvermittler in der Nahrung einen Einfluß auf den Benzpyrenanteil haben. Der Benzpyreng Gehalt eines Malzkaffee - Extraktes übertraf den der gerösteten Bohnen, aber nur ein vergleichsweise kleiner Teil ging in den Malzkaffee über. Beim Bohnenkaffee war zwar der Ausgangsgehalt an Benzpyren kleiner, durch den Lösungsvermittler Coffein ging jedoch vermutlich ein wesentlich größerer Anteil an Benzpyren in die flüssige Phase über, so daß die Endkonzentration höher lag als im Malzkaffee. Einen Überblick über den Benzpyreng Gehalt verschiedener Nahrungs- und Genußmittel gibt Tabelle 2, S. 18.

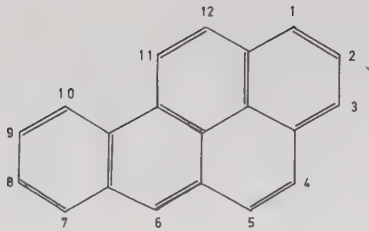


Abb. 4: 3,4-Benz(a)pyren

Produkt	Gehalt µg/kg
Schweinefett	-
Erdnußöl	0,5
Räucherschinken	3,2
Räucherfleisch	8,0
T-Knochen-Steak, holzkohlengegr.	50,0
Schweinekotelett, "	7,9
Tee (Extrakt)	3,9
Roggenbrot	1,1 - 1,6
Salatblätter	2,8 - 12,8
Grünkohl	12,6 - 24,5
Tomaten	0,2
Bäckerhefe	20,0
Malzkaffee	15,8
wässriger Extrakt aus Malzk.	1,2
Rückstand aus Malzkaffee	13,5
Röstkaffee - Extrakt	0,3 - 1,3
Röstkaffee	4,0
Mayonnaise	0,4

Tab. 2: 3,4-Benzpyrengelalt in pflanzlichen und tierischen Produkten
(aus: SCHMIDT, F., 1969, verändert)

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien

Als Testsubstanzen wurden eingesetzt:

1. Coffein (von der Fa. Merck, Darmstadt)
2. 3,4-Benz(a)pyren (von der Eastman Kodak Co., Rochester, USA)

Coffein wurde in physiologischer Lösung gelöst, Benzpyren wurde in Tricaprylin (von der Fluka AG, Ch-9470 Buchs, SG, bezogen) suspendiert.

Zur Darstellung der Schwesterchromatidaustausche bei der in vivo Methode (s. u. P. 2.3.2) wurden die Stoffe BUDR (5-Bromdesoxyuridin) und FUDR (5-Fluor-desoxyuridin) appliziert. Sie wurden von der Serva, Feinbiochemicafirma, Heidelberg bezogen.

2.2.2 Tiere

In dem Versuch wurden chin. Hamster (*Cricetulus griseus*) aus der Zucht der Institute für Humangenetik und Anthropologie der Universitäten Düsseldorf und Heidelberg genommen. Beide entstammen der Ursprungszucht aus Heidelberg. Die Tiere waren ca. 8-12 Wochen alt und wurden unter gleichen Bedingungen gehalten, d. h. gleiches Futter, gleiche Temperatur (20° C) und gleichen Tag- und Nachtrhythmus (von 6 Uhr bis 18 Uhr Licht, von 18 Uhr bis 6 Uhr kein Licht). Das Gewicht der Tiere lag zwischen 20 und 30 g. Insgesamt wurden 44 Tiere untersucht. 16 Tiere (zweimal jeweils 4 Männchen und 4 Weibchen) dienten als Kontrolltiere. Die eine Gruppe der Kontrolltiere erhielt 2x 0,5 ml Tricaprylin intraperitoneal im 24 Stundenintervall; die andere Gruppe der Kontrolltiere blieb unbehandelt.

Die Behandlung der Versuchstiere erstreckte sich über 2 Tage, wobei die Substanz im 24 Stundenintervall appliziert wurde. Coffein wurde oral mit einer Schlundsonde verabreicht und Benzpyren intraperitoneal gespritzt. 18 Stunden nach der letzten Applikation wurde das Knochenmark herauspräpariert und aufgearbeitet.

1. Appl. des Stoffes	2. Appl.	Aufarbeitung
0 Std.	24 Std.	42 Std.

Abb. 5: Schematische Darstellung der Applikation der Testsubstanzen

Benzpyren wurde pro Tier in einer Dosis von 450 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Es wurde in 0,5 ml Tricaprylin suspendiert. 8 Tiere wurden untersucht.

Für den Versuch mit Coffein wurden verschiedene Dosen gewählt:

1. 20 mg/kg/Tag gelöst in 0,5 ml physiolog. Lsg.
2. 100 mg/kg/Tag "
3. 200 mg/kg/Tag "
4. 400 mg/kg/Tag "

In jeder Serie wurden 6 Tiere aufgearbeitet und hiervon 4 Tiere untersucht.

2.3 Methoden

2.3.1 Knochenmark

Das Knochenmark erfüllt die Binnenräume der Knochen. Schon makroskopisch kann man gelbes und rotes Knochenmark unterscheiden. Beim Neugeborenen und in den ersten Lebensjahren ist das gesamte Mark rot, d. h. blutbildend. Mit zunehmendem Alter wird das rote Knochenmark durch gelbes, verfettetes Knochenmark ersetzt. Beim Erwachsenen findet man nur noch in den kurzen, platten Knochen, wie Rippen, Brustbein usw., blutbildendes Mark. Es sind vor allem 3 Vorgänge, die das morphologische Bild des Knochenmarks bestimmen, und zwar Zellvermehrung (Mitose) und Zellwachstum, Zellreifung und Zellausschwemmung. Bei der kurzen Lebensdauer der verschiedenen Blutzellen sind die Anforderungen an die Proliferationsfähigkeit des roten Knochenmarks außerordentlich groß, so müssen z. Bsp. jeden Tag 200 - 250 Milliarden rote Blutkörperchen gebildet werden (BUCHER, 1973). Aufgrund dieser ungeheuer großen Neubildung an Zellen steht eine große Anzahl von Zellen und damit Metaphasen zur Verfügung, die cytogenetisch analysierbar sind.

Als Versuchstier wird der chin. Hamster verwandt, weil er

1. genau wie der Mensch verschiedene Typen von Chromosomen besitzt, große und kleine metazentrische und akrozentrische Chromosomen.
2. eine geringe Anzahl von Chromosomen besitzt, $2n = 22$ Chromosomen. Diese geringe Zahl erleichtert die Auswertung.
3. morphologisch leicht differenzierbare Chromosomen besitzt. Das erleichtert ebenfalls die Auswertung (s. Abb. 6, S. 22).

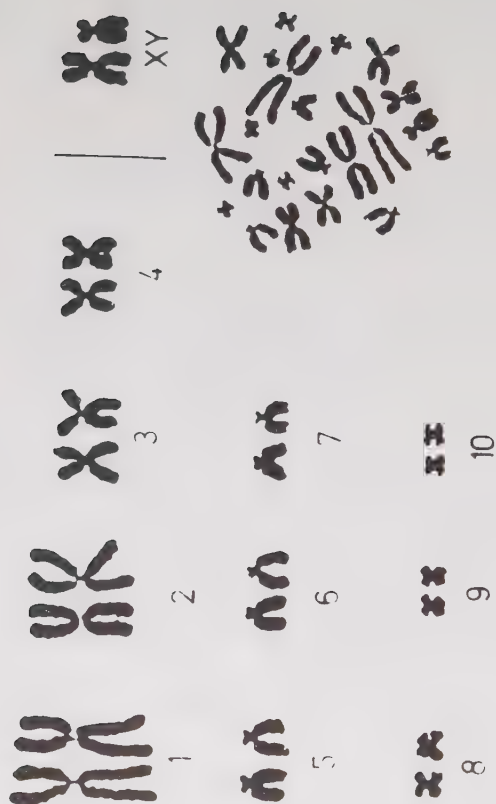


Abb. 6: Bild des normalen Karyotyps des chin.
Hamsters, $2n = 22$ Chromosomen

Die Präparation der Chromosomen erfolgte nach einer Methode von SCHMIDT und STAIGER (1969), die von MILTENBURGER (pers. Mitteilung) wie folgt abgewandelt wurde:

1. 16 Stunden nach der letzten Applikation des Mutagens, 2 Stunden vor der Präparation, wird den Versuchstieren 0,1 ml / 10 g Körpergewicht Colchicinlösung intraperitoneal gespritzt (Colchicinlösung = 10 mg Colchicin / 10 ml physiolog. Lösung).
2. 2 Stunden nach der Colchicingabe werden die Tiere in Äther getötet.
3. Dann werden die beiden Oberschenkelknochen herauspräpariert.
4. Durch kurzes Abschneiden der distalen und proximalen Enden wird der Knochenmarkkanal eröffnet.
5. Mit Zimmertemperatur warmer physiologischer Lösung wird das Knochenmark herausgespült (ca. 1 ml / Femur).
6. Das ausgespülte Material wird gründlich aufpipettiert und dann 10 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.
7. Bei der nachfolgenden hypotonen Behandlung gibt man ca. 2 ml 1% Natriumcitratlösung zum Zentrifugat, pipettiert gründlich auf und läßt dann das verschlossene Zentrifugenröhrchen 25 - 30 Minuten im Wasserbad bei einer Temperatur von 30° C stehen.
8. Anschließend zentrifugiert man wieder 10 Minuten bei 1500 rpm. Der Überstand wird verworfen.

9. Zum anschließenden Fixieren gibt man ca. 2 ml Fixierlösung (frisch zubereitet) zum Sediment, pipettiert wiederum gründlich auf, verschließt das Zentrifugenröhrchen und läßt es 30 Minuten im Kühlschrank stehen (Fixierlösung = Eisessig : Äthanol = 1 ml : 2,5 ml).
10. Anschließend zentrifugiert man wieder 10 Minuten bei 1500 rpm und verwirft den Überstand.
11. Danach wird das Zentrifugat nochmals fixiert, aufpipettiert, das Röhrchen anschließend verschlossen und dann über Nacht im Kühlschrank stehen gelassen.
12. Am nächsten Tag erfolgt zunächst wieder eine 10 Minuten dauernde Zentrifugation. Der Überstand wird verworfen.
13. Anschließend fixiert man mit ca. 0,5 ml Fixierlösung, wobei die Lösung tropfenweise zum Zentrifugat gegeben wird, bis eine milchige Suspension entsteht.
14. Ca. 10 Tropfen dieser Suspension werden auf eisgekühlte, mit Aqua dest. benetzte Objektträger aufgetropft, verblasen und über dem Bunsenbrenner abgeflammt.
15. Die Präparate läßt man dann an der Luft trocknen.

2.3.2 SCE - Methode

Um die Schwesterchromatiden in der Färbung unterschiedlich darstellen zu können, wurden die Tiere 24 Stunden vor der Colchicingabe, also 26 Stunden vor der Knochenmarkpräparation, mit FUDR I intra-peritoneal gespritzt. 2 Stunden nach dieser Applikation wurden FUDR II und BUDR 9 Stunden lang stündlich i.p. gespritzt.

Die Stammlösungen für FUDR I, FUDR II und BUDR wurden folgendermaßen angesetzt:

FUDR I : 16 mg FUDR / 10 ml physiolog. Lsg.
FUDR II : 24 mg FUDR / " , 1 : 10 verdünnt
BUDR : 24 mg BUDR / "

Je nach Gewicht bekamen die Tiere folgende Mengen appliziert:

Körpergewicht	FUDR I	FUDR II	BUDR
20 g	0,60 ml	0,20 ml	0,30 ml
25 g	0,70 ml	0,22 ml	0,40 ml
30 g	0,80 ml	0,27 ml	0,25 ml

2 Stunden vor der Knochenmarkpräparation wurde dann Colchicin intraperitoneal verabreicht, um die Mitosen im Metaphasenstadium zu blockieren.

Somit ergibt sich folgendes Applikationsschema:

Zeit	FUDR I	FUDR II	BQDR	Mutagen
0 Std.				1. Applik.
16 "	x			
18 "		x	x	
19 "		x	x	
20 "		x	x	
21 "		x	x	
22 "		x	x	
23 "		x	x	
24 "		x	x	2. Applik.
25 "		x	x	
26 "		x	x	
40 "	Colchicin			
42 "	Knochenmarkpräparation			

Abb. 7: Schemat. Darstellung der zeitlichen Applik.
von FUDR und BUDR

Nachdem nun die Präparate mindestens 2 Tage gealtert waren, wurden sie mit Hilfe der Färbung Höchst 33258-Giemsa (nach LATT (1974), PERRY und WOLFF (1974) und EPPLER (1975)) gefärbt:

1. Zunächst werden die Präparate 10 Minuten in Höchstlösung gefärbt. Die Färbelösung erhält man folgendermaßen: Man löst 5 mg Höchst 33258 in 100 ml Speziallösung. Diese Lösung 2x 1 : 100 verdünnt mit Speziallösung ergibt die fertige Gebrauchslösung.
2. Anschließend werden die Präparate zweimal in pH 6,8 gepuffertem Aqua dest. gut gespült.

3. Dann folgt eine 25 Minuten dauernde UV-Bestrahlung (254 nm, 20 cm Abstand der UV-Lampe zu den Präparaten). Hierbei müssen die Präparate gut mit gepuffertem Aqua dest. bedeckt sein.
4. Nach der Bestrahlung läßt man die Präparate 90 Minuten in SSC 2 fach bei 60° C im Wasserbad stehen.
5. Anschließend müssen die Präparate an der Luft abkühlen und dann 10 Minuten in Giemsa gefärbt werden (Färbelösung = 7 ml Giemsa + 10 ml Lsg. A + 10 ml Lsg. B + 73 ml Aqua dest.).
6. Schließlich spült man die Präparate gut in Aqua dest. (zweimal).
7. Nachdem die Präparate an der Luft trocken geworden sind, werden sie mit Eukitt eingedeckt.

Herstellung der Lösungen:

Lösung A: 45.36 g $\text{NH}_2 \text{PO}_4$ auf 1000 ml Aqua dest.

Lösung B: 59.33 g $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ auf 1000 ml Aqua dest.

Speziallsg. für Höchst

4.4736 g K Cl

+17.5320 g NaCl

auf 2000 ml Aqua dest.

SSC 12 fach (Stammlsg.):

105.1 g NaCl

+53.0 g $\text{Na}_3\text{Citrat } 2\text{H}_2\text{O}$

auf 1000 ml Aqua dest.

SSC 2 fach (Gebrauchslsg.): 83.0 ml Aqua dest.

+17.0 ml SSC 12 fach

2.3.3 Kriterien der Auswertung

Die Auswertung der Präparate erfolgte lichtmikroskopisch bei 1000 facher Vergrößerung (Objektiv: 100x in Ölimmersion, Okular: 10x). Von jedem Tier wurden 50 Metaphasen ausgewertet. Bei der Auswertung wurden nicht die Austauschstücke gezählt, sondern die Schnittstellen. Es galten nur die Metaphasen als auswertbar, die $2n = 22$ Chromosomen besaßen. Aneuploide oder polyploide Metaphasen wurden nicht untersucht. Weiterhin wurden auch die Metaphasen, bei denen nicht alle Chromosomen (einschließlich der Geschlechtschromosomen) unterschiedlich gefärbt waren, nicht ausgewertet.

Zur statistischen Absicherung wurde der t-Test herangezogen.

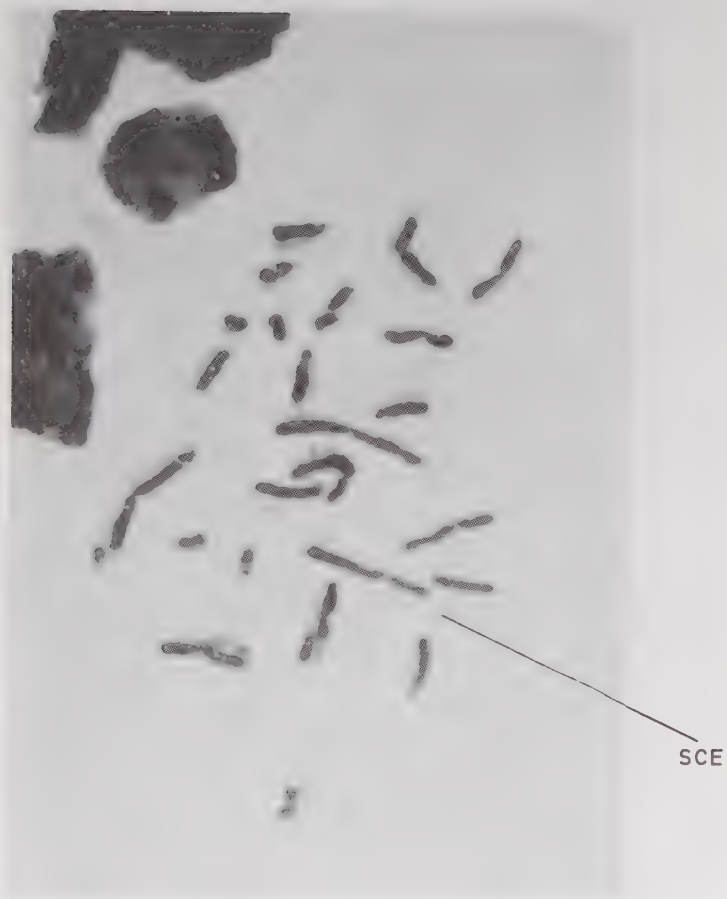


Abb. 8: Chromosomen des chin. Hamsters bei
der SCE - Methode

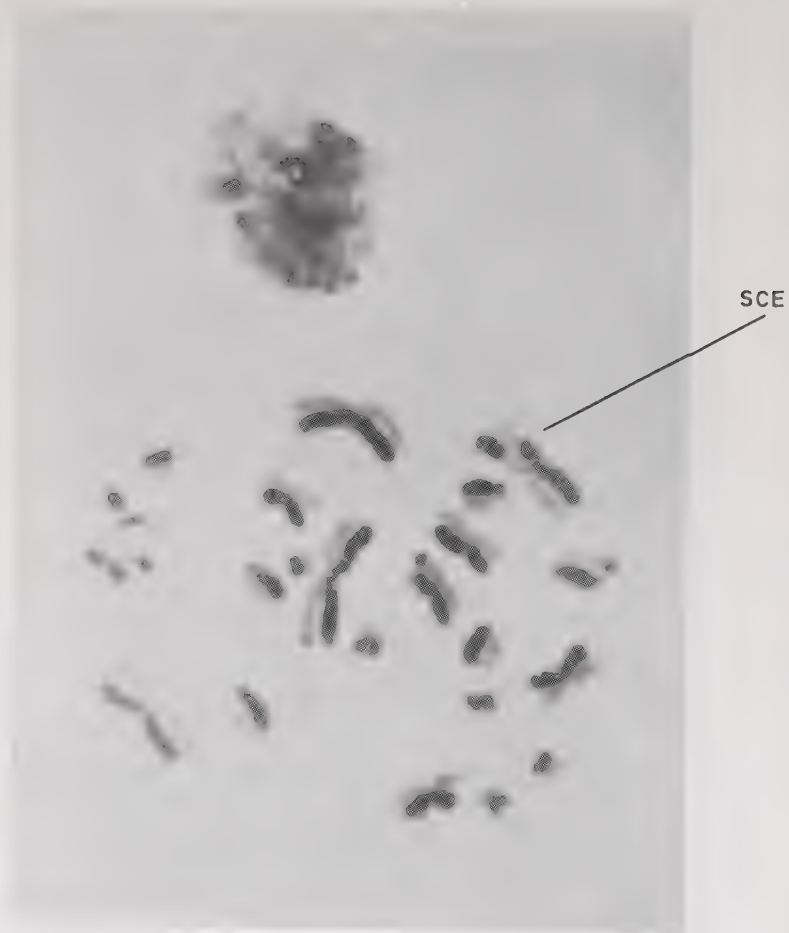


Abb. 9: Chromosomen des chin. Hamsters bei
der SCE - Methode

3. ERGEBNISSE

Die Kontrolltiere des Coffeinversuchs wurden nicht vorbehandelt, d. h. sie erhielten auch das Lösungsmittel nicht appliziert, da in langjährigen Versuchen des Institutes gezeigt wurde, daß das Lösungsmittel nicht mutagen ist. Bei der Auswertung ergab sich, daß spontane Schwesterchromatidaustausche auftreten können. Die Rate lag bei den Weibchen bei $3,6 \pm 0,34$ SCEs/Zelle und bei den Männchen bei $3,8 \pm 0,22$ SCEs/Zelle (s. Tab. 3 und 4). Die Werte liegen damit im Bereich der von anderen Autoren aufgeführten Werte. BAYER und BAUKNECHT (1976) fanden bei ihren Versuchen Kontrollwerte von $3,2 \pm 1,2$ SCEs/Zelle und $3,4 \pm 1,4$ SCEs/Zelle.

Bei der zweimaligen oralen Applikation von Coffein ergab sich eine Steigerung der SCE Rate. Sie stieg von 3,7 SCEs/Zelle (bei 2 x 20 mg Coffein / kg Körpergewicht) über 4,95 SCEs/Zelle (bei 2 x 100 mg) auf sogar 5,63 SCEs/Zelle (bei 2 x 200 mg). Nach Applikation von 2 x 400 mg Coffein / kg Körpergewicht lag die SCE-Rate mit 5,0 SCEs/Zelle unter den Werten für die Dosis von 2 x 200 mg, jedoch noch innerhalb der Streubreite (s. Tab. 5 und Abb. 12).

Bei der Auswertung getrennt nach Männchen und Weibchen ergaben sich geringe, jedoch nicht signifikante Unterschiede (s. Tab. 3 u. 4 und Abb. 10 u. 11).

Tier- nummer	Metaphasen	Kontroll- tiere	20 mg Coffein/kg	100 mg Coffein/kg	200 mg Coffein/kg	400 mg Coffein/kg
1	50	3,3	3,8	4,1	5,3	5,5
2	50	4,1	4,0	5,7	6,7	4,9
3	50	3,7	-	-	-	-
4	50	3,4	-	-	-	-
$\bar{x}$	-	3,6	3,95	4,9	6,0	5,2
s	-	0,34	0,07	1,13	0,98	0,42

Tab. 3: verschiedene Coffeindosen bei weiblichen Tieren

Tier- nummer	Metaphasen	Kontroll- tiere	20 mg Coffein/kg	100 mg Coffein /kg	200 mg Coffein /kg	400 mg Coffein /kg
1	50	4,0	3,4	4,8	5,3	4,4
2	50	3,5	3,5	5,2	5,2	5,2
3	50	3,7	-	-	-	-
4	50	4,0	-	-	-	-
$\bar{x}$	-	3,8	3,45	5,0	5,25	4,8
s	-	0,22	0,07	0,28	0,07	0,56

Tab. 4: verschiedene Coffeindosen bei männlichen Tieren

	Kontroll- tiere	20 mg Coffein/kg	100 mg Coffein/kg	200 mg Coffein/kg	400 mg Coffein/kg
Mittelwert $\bar{x}$	3,7	3,7	4,95	5,63	5,00
Standardabw. s	0,28	0,07	0,70	0,53	0,48

Tab.5: verschiedene Coffeindosen bei männlichen und weiblichen Tieren

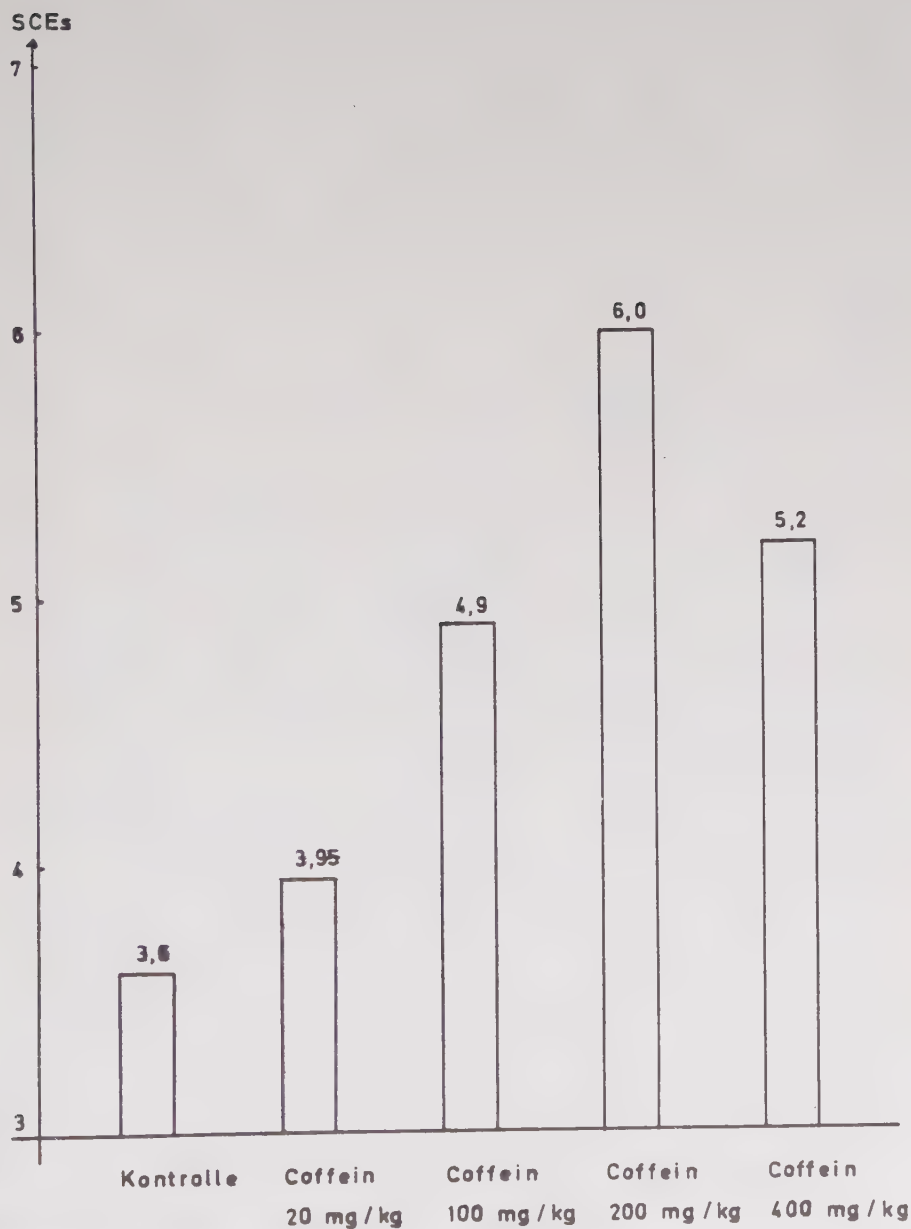


Abb. 10 : graphische Darstellung der Ergebnisse bei verschiedenen Coffeindosen (Weibchen)

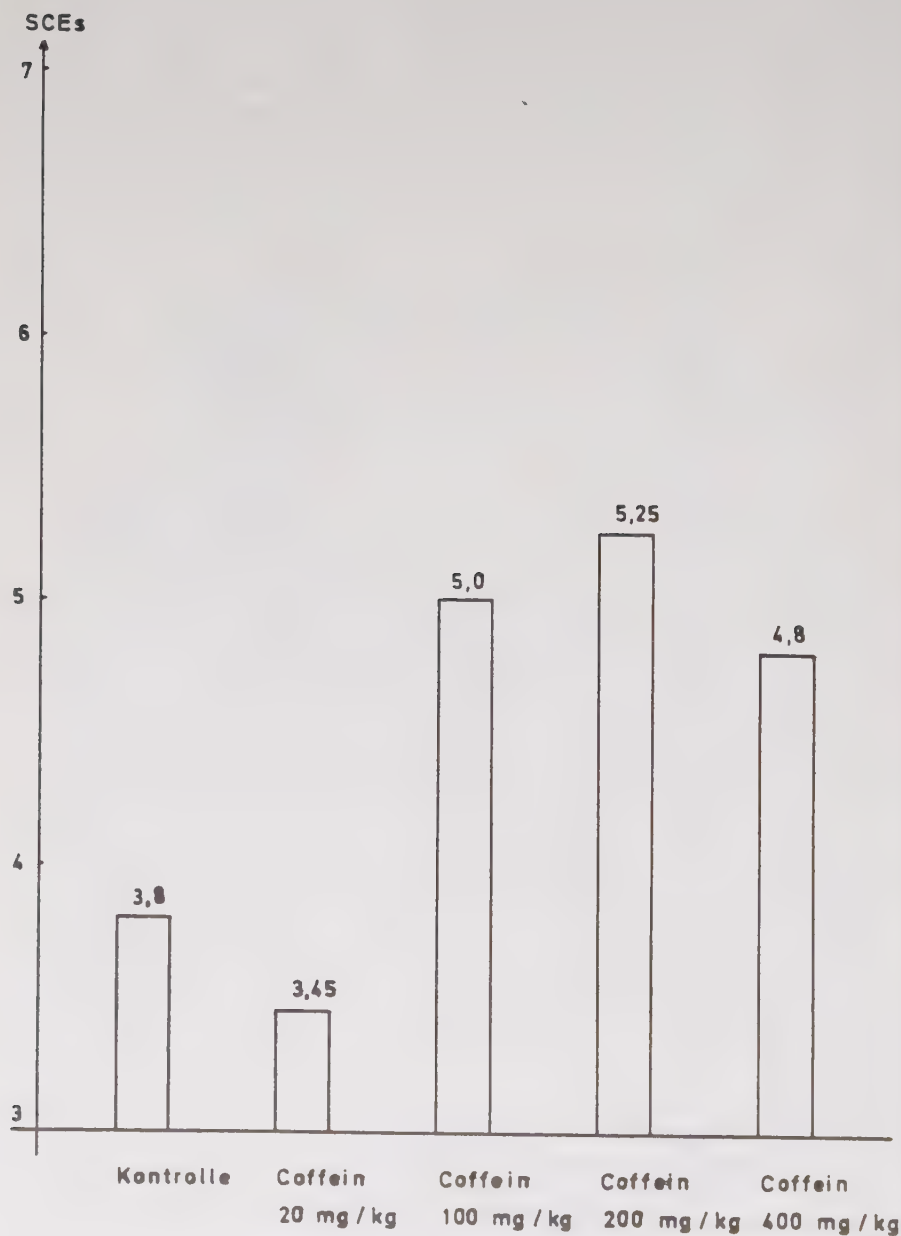


Abb. 11: graphische Darstellung der Ergebnisse bei verschiedenen Coffeindosen (Männchen)

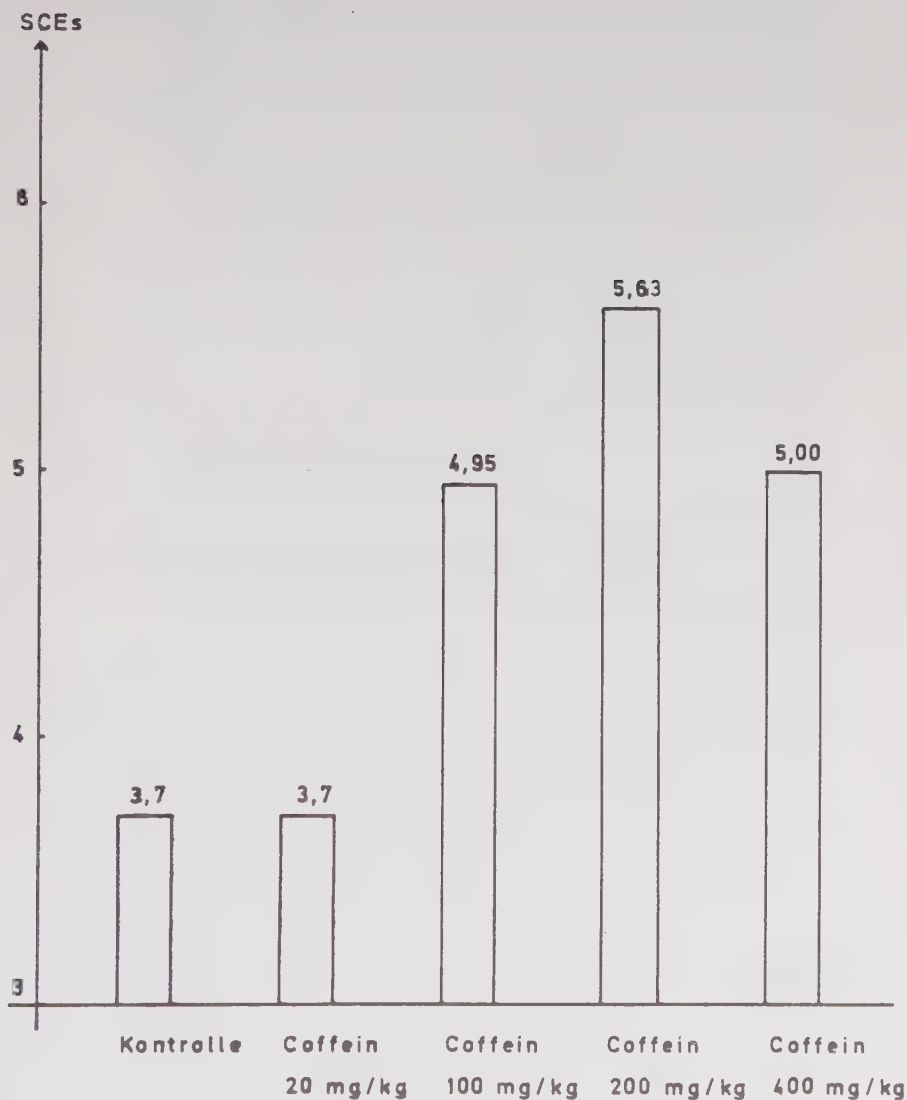


Abb. 12: graphische Darstellung der Ergebnisse bei verschiedenen Coffeindosen (Männchen und Weibchen)

Parallel zu meinen Untersuchungen wurde am hiesigen Institut in einer weiteren Doktorarbeit (G. ROSZINSKY-KÜCHER, persönl. Mitt.) die Induktion von Schwesterchromatidaustauschen nach intraperitonealer Injektion von Benzpyren untersucht. Diese Werte wurden von mir übernommen. Ebenfalls wurden von mir die Werte für die dazugehörigen Kontrolltiere übernommen. Da die Tiere beider Versuche aus dem gleichen Pool entstammen und die Auswertung nach gleichen Kriterien erfolgte, können diese Werte in unmittelbarer Korrelation zu den von mir erhobenen Befunden aufgestellt werden (s. Tab. 6 u. 7, Abb. 13 u. 14). Die Tiere wurden 24 Stunden nach der letzten Mutagenapplikation aufgearbeitet.

Wie G. ROSZINSKY-KÜCHER zeigen konnte, kam es nach Benzpyrenapplikation zu einem starken Anstieg der SCE Rate/Zelle (s. Tab. 8 und Abb. 15). Die Kontrolltiere, die Tricaprylin intraperitoneal erhalten hatten, lagen mit $3,9 \pm 0,68$ SCEs/Zelle noch in dem Bereich der Kontrolltiere, die nichts bekommen hatten.

In einer weiteren Versuchsserie wurde nun von mir untersucht, welchen Einfluß Coffein auf die von Benzpyren induzierte SCE Rate hat. Bei der simultanen Applikation von 2 x 450 mg Benzpyren / kg Körpergewicht und 2 x 200 mg Coffein / kg Körpergewicht lag die SCE Rate pro Zelle bei 7,05. Sie lag damit erheblich unter dem Wert, den man bei zweimaliger Gabe von nur Benzpyren erhielt. Hier lag die Rate nämlich bei 10,55. Es kam also zu einer Hemmung des Schwesterchromatidaustauschs. Die SCE Rate/Zelle war aber höher als die Rate, die man bei alleiniger Applikation von 200 mg Coffein erhielt. Hier lag der Wert bei 5,63 SCEs/Zelle (s. Tab. 8 und Abb. 15).

Auch bei dieser Versuchsserie erhielt man bei der getrennten Auswertung von Männchen und Weibchen geringe Unterschiede, die aber nicht signifikant waren (s. Tab. 6 u. 7 und Abb. 13 u. 14).

Tier- nummer	Metaphasen	Kontrolltiere	Coffein 200 mg / kg	Benzpyren 450 mg / kg	Coffein und Benzpyren
1	50	4,98	5,3	13,44	8,3
2	50	2,56	8,8	11,32	6,4
3	50	3,54	-	8,16	-
4	50	3,80	-	8,60	-
$\bar{x}$	-	3,70	6,05	10,40	7,35
s	-	0,98	0,99	2,45	1,34

Tab. 8: Coffein- und Benzpyrenapplikation bei weiblichen Tieren

Tier- nummer	Metaphasen	Kontrolltiere	Coffein 200 mg / kg	Benzpyren 450 mg / kg	Coffein und Benzpyren
1	50	4,50	5,3	10,20	7,5
2	50	3,60	5,2	10,12	6,0
3	50	4,10	-	11,76	-
4	50	4,04	-	10,80	-
$\bar{x}$	-	4,1	5,25	10,70	6,75
s	-	0,38	0,07	0,73	1,06

Tab. 7: Coffein- und Benzpyrenapplikation bei männlichen Tieren

	Kontroll - tiere	Coffein 200 mg / kg	Benzpyren 450 mg / kg	Coffein und Benzpyren
Mittelwert $\bar{x}$	3,9	5,63	10,55	7,05
Standardabw. s	0,68	0,53	1,59	1,20

Tab.8: Coffein- und Benzpyrenapplikation bei männlichen und weiblichen Tieren

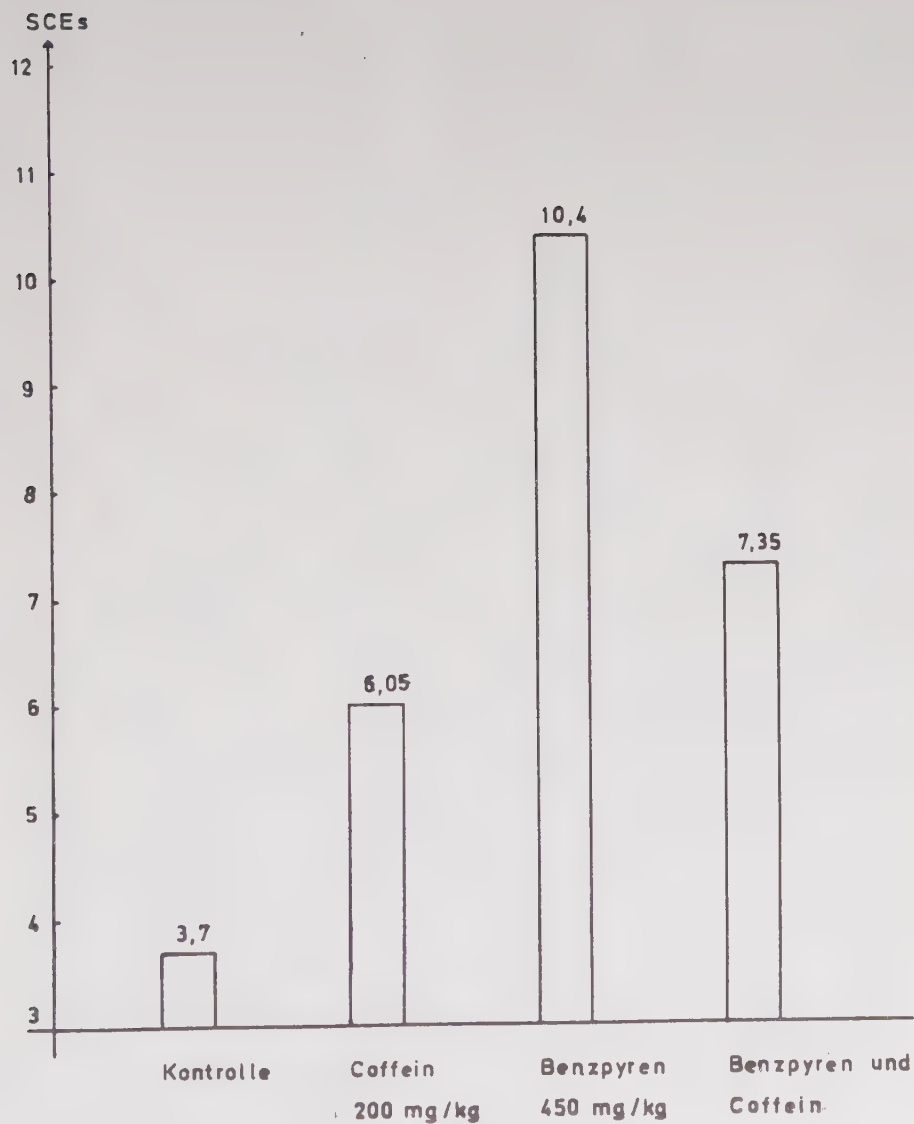


Abb. 13: graphische Darstellung der Ergebnisse bei Coffein- und Benzpyrenapplikation (Weibchen)

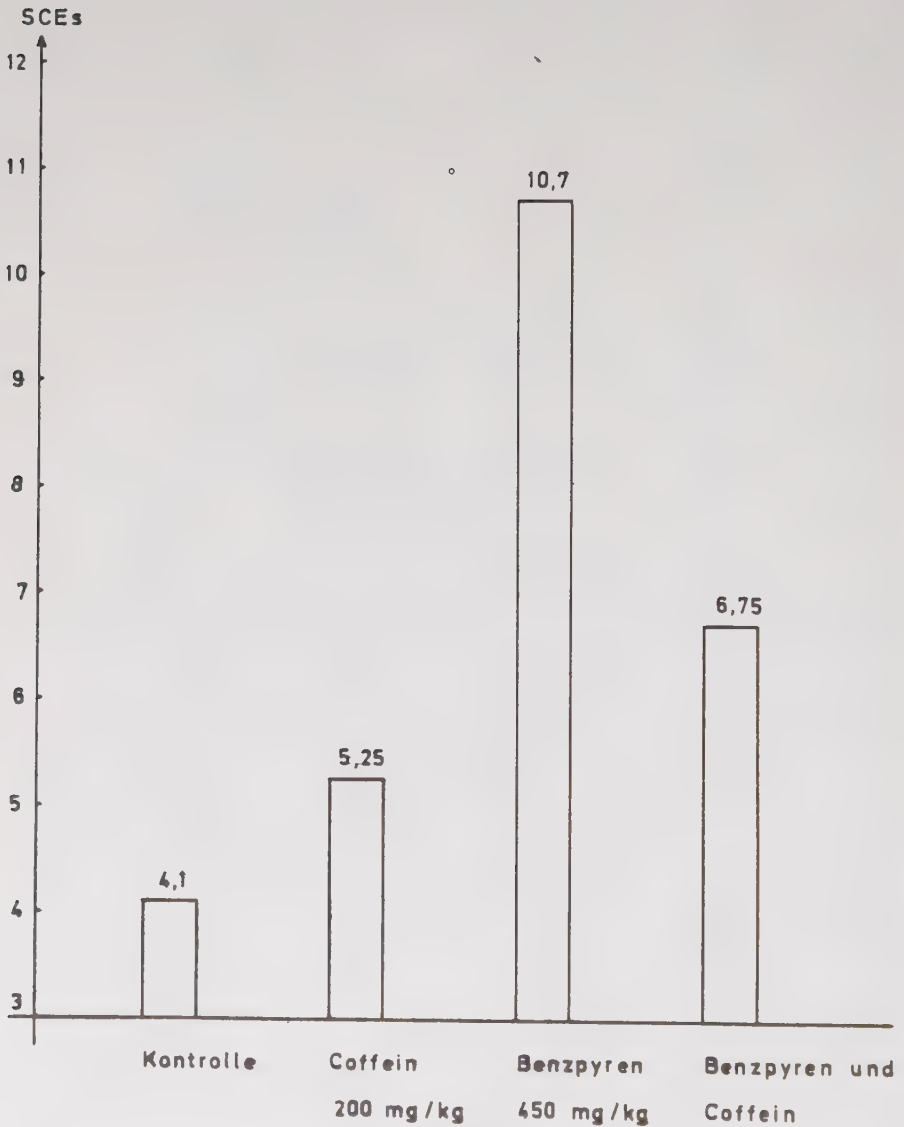


Abb. 14: graphische Darstellung der Ergebnisse bei Coffein- und Benzpyrenapplikation (Männchen)

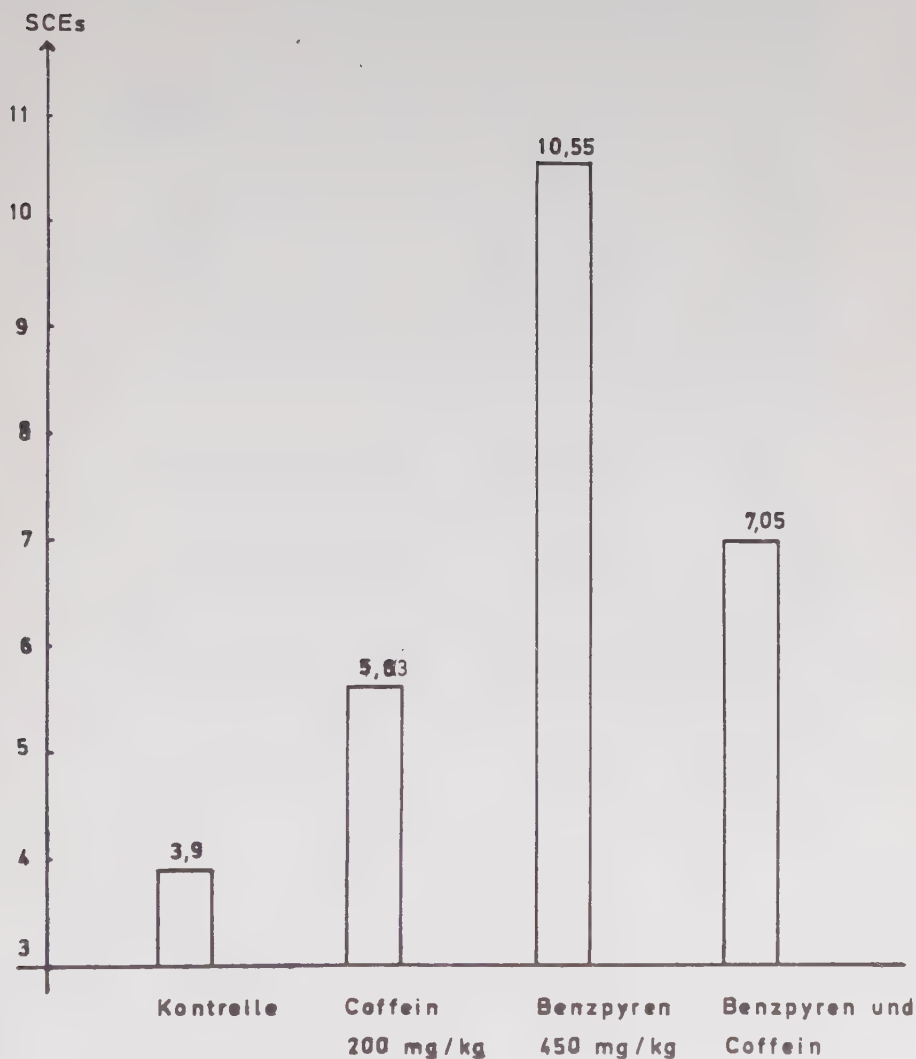


Abb. 15: graphische Darstellung der Ergebnisse bei Coffein - und Benzpyrenapplikation (Männchen und Weibchen)

Bereits die Mittelwerte zeigten in allen Versuchen im Vergleich zur Kontrolle eine Erhöhung der SCE Rate. Zur statistischen Absicherung wurden die Mittelwerte, die Standardabweichungen und der p-Wert mit Hilfe des t-Testes berechnet. Mit Ausnahme des Wertes von 20 mg Coffein und des Wertes von 200 mg Coffein in der Benzpyrenserie konnten die Ergebnisse mit einem p-Wert von $<0,02$ abgesichert werden. In einer weiteren Untersuchung von BASLER, A., BACHMANN, U., ROSZINSKY-KÜCHER, G., RÜHRBORN, G. (Mut. Res., in press) wurde die Anzahl der ausgewerteten Metaphasen in allen Serien verdoppelt. Die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigten Befunde bestätigten sich dabei.

<u>Serie</u>	<u>t-Test zur Kontrolle</u>
Kontrolle (unbehandelt)	—
2 x 20 mg Coffein	$p > 0,02$
2 x 100 mg Coffein	$p < 0,02$
2 x 200 mg Coffein	$p < 0,01$
2 x 400 mg Coffein	$p < 0,01$

Tab. 9: Berechnung der p-Werte der verschiedenen Coffeinserien mit Hilfe des t-Testes

<u>Serie</u>	<u>t-Test zur Kontrolle</u>
Kontrolle (0,5 ml Lösungsmittel Tricaprylin)	—
2 x 200 mg Coffein	$p < 0,1$
2 x 450 mg Benzpyren	$p < 0,02$
2 x 200 mg Coffein +	
2 x 450 mg Benzpyren	$p < 0,02$

Tab. 10: Berechnung der p-Werte der Coffein- und Benzpyrenserie mit Hilfe des t-Testes

4. DISKUSSION

Zur Frage der Mutagenität von Coffein gibt es unterschiedliche Aussagen. W. OSTERTAG berichtete 1965 über eine Coffein- und Theophyllin-induzierte Mutagenese bei Zell- und Leukozytenkulturen des Menschen. Die Befunde bei Drosophila sind widersprüchlich (OSTERTAG und HAAKE, 1966, ALDERSON und KHAN, 1967). Die Untersuchungen an Mäusen und damit Säugern verliefen negativ (S. EPSTEIN, 1970, G. RÜHRBORN, 1972). Untersuchungen mit der SCE-Methode, allerdings an Zellkulturen, waren positiv (KATO, 1974). Er untersuchte Coffein in verschiedenen Dosen und fand eine konzentrationsabhängige Steigerung der SCE Frequenz. Nach allgemeiner Auffassung kommt solchen in vitro Versuchen keine allzu große Bedeutung zu, da keine Korrelation zum Menschen herzustellen ist. Daher wurde in dieser Arbeit der in vivo Versuch angewandt. Auch hier wurde eine Erhöhung der SCE Frequenz bei steigenden Coffeinkonzentrationen gefunden. Somit wäre durch die sensible SCE-Methode eine schwache Mutagenität von Coffein im in vivo Versuch nachgewiesen. Bei der niedrigsten Coffeindosis von 20 mg / kg Körpergewicht war die Frequenz jedoch nicht wesentlich erhöht gegenüber der von Kontrolltieren, die das reine Lösungsmittel, nämlich physiologische Lösung, bekommen hatten. Diese Dosis ist auf den Menschen umgerechnet schon an der Grenze der oberen Norm, und es ist fraglich, ob jene Dosen, bei denen eine Erhöhung der SCE Rate gefunden wurde, überhaupt jemals im Menschen auftreten.

Weiterhin scheint zwischen 200 mg und 400 mg Coffein / kg ein Sättigungspunkt zu existieren, denn die SCE Rate ist bei 400 mg gegenüber 200 mg leicht erniedrigt; der Wert liegt jedoch noch innerhalb der Streubreite.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung von Benzpyren auf die SCE Frequenz zu überprüfen. Eine mutagene Wirkung von Benzpyren war schon seit längerer Zeit bekannt. Mit der SCE-Methode fand sich eine erhebliche Steigerung der SCE Rate / Metaphase. Dabei ist zu berücksichtigen, daß den Versuchstieren die Substanz intraperitoneal verabreicht wurde. Es liegen nämlich unveröffentlichte Ergebnisse vor (BACHMANN, U.), bei denen Benzpyren oral mit einer Schlundsonde appliziert wurde. Hierbei fand sich eine nur geringe Erhöhung der SCE Frequenz. Nach BROCK und MITARBEITER 1938 (in BAUER, 1949) wird Benzpyren bei oraler Verabreichung im Magen-Darm-Kanal chemisch als auch adsorptiv relativ fest gebunden, was der Resorption stark entgegenwirkt. Damit läßt sich erklären, daß unter Umgehung des Magen-Darm-Kanals ein wesentlich besseres Ergebnis erzielt wurde. Das Ergebnis stimmt überein mit den Versuchen von BAYER und BAUKNECHT 1976. Sie untersuchten u. a. Benzpyren in verschiedenen Dosen und fanden eine nicht-lineare Steigerung der SCE Frequenz bei steigenden Dosen. Bei 100 mg / kg Körpergewicht betrug die SCE Rate ca. 8 / Metaphase.

Das Lösungsmittel für Benzpyren, Tricaprylin, erwies sich als nicht mutagen. Die SCE Rate lag hierbei im Bereich der Werte der Kontrolltiere, die nicht behandelt worden waren.

Eine dritte Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die simultane Applikation von Benzpyren und Coffein, um daraus Rückschlüsse auf den Mechanismus des Schwesterchromatidaustauschs zu ziehen.

Die verschiedenen Untersuchungen zur mutagenen Wirkung von Coffein führten zu unterschiedlichen Aussagen über den Wirkungsmechanismus der Coffein-mutagenese. Nach TS'0 et al. (1963) bildet Coffein

mit der DNA Komplexe. Dadurch ginge die doppelsträngige DNA Struktur teilweise in eine ungeordnete Spiralform über. W. OSTERTAG (1965) scheint eine mutationsauslösende Wirkung von Coffein durch Einbau in die DNA unwahrscheinlich. Ein Einbau in die DNA würde seiner Meinung nach voraussetzen, daß die N⁷ Methylgruppe im Coffein entfernt würde. Das entstehende Produkt wäre Theophyllin. Er fand aber bei seinen Untersuchungen, daß Theophyllin nur 1/8 bis 1/10 so wirksam ist wie Coffein.

Nach HARM (1970) bindet sich Coffein vorzugsweise an geschädigte Stellen der DNA. Dadurch verhindert es den Reparatonsmechanismus (KIHLMAN et al., 1973, 1974). Sie fanden nämlich, daß entstehende gaps normalerweise wenige Stunden nach ihrer Entstehung repariert wurden, in Anwesenheit von Coffein dagegen wurde der Reparatonsmechanismus unterdrückt.

Nach BENDER (1974) sind nun die Schwesterchromatidaustausche diejenigen Stellen in den Chromosomen, an denen eine Reparatonsmechanismus stattgefunden hat. Bei einer gleichzeitigen Gabe von Benzpyren und Coffein würde sich das Coffein an die durch Benzpyreneinwirkung geschädigten Stellen der DNA anlagern und so die Reparatonsmechanismus verhindern, was sich in einer niedrigeren SCE Rate bemerkbar machen würde. Übereinstimmend mit dieser Theorie wurde nun in der vorliegenden Arbeit festgestellt, daß bei gleichzeitiger Gabe von Benzpyren und Coffein die SCE Frequenz erheblich absank. Es wäre jedoch falsch, das vorliegende Ergebnis nur mit dieser Theorie zu erklären. Wenn Coffein den Reparatonsmechanismus verhindert, dürften bei der alleinigen Applikation von Coffein keine SCEs auftreten, weder bei hohen noch bei niedrigen Konzentrationen, da Coffein auch die spontan auftretenden SCEs unterdrücken würde. Nach VOGEL (pers. Mitt.) ließe sich die Erniedrigung der SCE Frequenz bei

simultaner Gabe von Benzpyren und Coffein aber erklären, wenn man 2 Theorien, nämlich die von BENDER (1974) und die von SHAFER (1977), vereint.

Nach der Theorie von SHAFER (1977) entstehen die SCEs an den Chromosomen aufgrund eines crosslinks zwischen den beiden DNA Strängen eines Chromatids. Die Replikation der Komplementärstränge wird an dieser Stelle dann behindert, so daß die DNA dann reißt, und die Chromatiden vertauscht wieder anwachsen.

Die Erniedrigung der SCE Frequenz bei der simultanen Applikation von Benzpyren und Coffein könnte man nun so erklären, daß derjenige Teil der SCEs, der mit dem Reparationsmechanismus zu erklären ist, durch Coffein verhindert wird und daher die SCE Rate absinkt. Den restlichen Teil der SCEs müßte man mit der crosslink Theorie erklären.

Im Vergleich zu dieser Methode wurden parallel zu meinen Untersuchungen am Institut für Humangenetik und Anthropologie an der Universität Düsseldorf in einer weiteren Doktorarbeit beide Testsubstanzen mit Hilfe einer cytogenetischen Methode (Chromosomenaberrationen im Knochenmark des chin. Hamsters) untersucht (S. TASCHE, 1977). Bei S. TASCHE fand sich nach simultaner Applikation von Coffein und Benzpyren eine Erhöhung der Chromosomenaberrationen. Schon daraus ist zu ersehen, daß der Mechanismus des Schwesterchromatidaustauschs ein anderer sein muß als der einer normalen Chromosomenaberration.

Die steigende SCE Rate bei der Applikation verschiedener Coffeindosen läßt sich weder mit der einen noch mit der anderen Theorie erklären. Bis jetzt weiß man nur, daß Coffein den Reparationsmechanismus verhindert.

Wenn man bei dem vorliegenden Ergebnis die cross-link Theorie zu Hilfe nimmt, müßte man bei Coffein einen Effekt vermuten, der das Auftreten von cross-links begünstigt.

In jüngerer Zeit führten VOGEL und BAUKNECHT (1978) eine Untersuchung über den Effekt von Coffein auf die SCE Rate nach Behandlung der Zellen mit UV-Licht oder Triaziquone durch. Ohne zusätzliche Applikation von Coffein zeigten die Zellen eine hohe SCE Rate. Bei simultaner Applikation mit Coffein sank die SCE Rate; die Zellen wiesen aber auch schwerste Aberrationen auf, d. h. es kam in hohem Maße zu fragmentierten und pulverisierten Zellen. Diese Metaphasen wurden von der Auswertung ausgeschlossen, "resulting in the reduction of the mean number of SCE per metaphase" (VOGEL und BAUKNECHT, 1978). Das Absinken der SCE Rate ist also nach VOGEL und BAUKNECHT durch diese Selektion der Zellen zu erklären, nicht aber durch einen Prozeß des Coffeins, der die SCE Bildung verhindert. Diesen Effekt konnten aber nur VOGEL und BAUKNECHT im in vitro Versuch mit hohen Gaben von mutagenen Substanzen zeigen. Aus diesem Grunde führten BASLER et al. (1978) Untersuchungen im in vivo Versuch durch. Hierbei ergaben eine simultane Applikation von Coffein und Cyclophosphamid als auch Coffein und Benzpyren ein Absinken der SCE Rate. Ein Anstieg der Aberrationen wurde in vivo nicht beobachtet. Auch traten nie Fragmentationen oder pulverisierte Zellen auf.

KIHLMAN (1975) und PALITTI und BECCHETTI (1977) fanden bei ihren Untersuchungen keine Herabsetzung der SCE Frequenz bei Gabe von einigen chemischen Mutagenen und Coffein. Der Grund dafür mag aber in der verschiedenen Metabolisierung der Substanzen zu suchen sein. KIHLMAN und PALITTI und BECCHETTI

führten ihre Untersuchungen an Zellkulturen durch, BASLER et al. führten die Untersuchungen jedoch im in vivo Versuch durch. Auch wurden bei ihnen die Substanzen simultan gegeben, während bei PALITTI und BECCHETTI Coffein nach der Behandlung mit chem. Mutagenen gegeben wurde. Da Coffein und Benzpyren Molekularkomplexe bilden, ist es auch möglich, daß die Erniedrigung der SCE Rate durch eine Interaktion zwischen diesen beiden Substanzen zustande kommt. Um das zu klären, sind weitere in vivo Versuche erforderlich, bei denen die Tiere einer Behandlung mit chem. Mutagenen unterzogen werden und dann mit Coffein nachbehandelt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, zum einen eine mögliche mutagene Wirkung von Coffein zu untersuchen; zum anderen sollte der Effekt einer simultanen Gabe von Coffein und Benzpyren, im Gegensatz zu einer alleinigen Applikation von Benzpyren, am Knochenmark des chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*) untersucht werden. Die Substanzen wurden den Tieren zweimal im 24 Stundenintervall verabreicht, Coffein auf oralem Wege, Benzpyren intraperitoneal. 18 Stunden nach der letzten Applikation wurden die Tiere aufgearbeitet. Benzpyren wurde in einer Dosis von 450 mg / kg verabreicht, Coffein in vier verschiedenen Dosen: 20 mg / kg, 100 mg / kg, 200 mg / kg und 400 mg / kg. Bei der simultanen Applikation von Benzpyren und Coffein wurde Benzpyren in einer Dosis von 450 mg / kg und Coffein von 200 mg / kg verabreicht.

Als Testsystem diente die SCE-Methode.

Bei der Auswertung der Chromosomen zeigte sich, daß Benzpyren die SCE Rate um fast das dreifache der Kontrolltierwerte erhöhte.

Coffein zeigte gegenüber Benzpyren nur eine schwache mutagene Wirkung. Bis 200 mg / kg war die SCE Rate dosisabhängig. Zwischen 200 mg und 400 mg scheint ein Sättigungspunkt zu existieren, da die SCE Rate bei 400 mg leicht absank.

Bei der simultanen Applikation von Benzpyren und Coffein sank die SCE Rate erheblich ab gegenüber der alleinigen Gabe von Benzpyren.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- ADLER, I.-D.: The problem of caffeine mutagenicity.
In: Chemical Mutagenesis in Mammals and Man
VOGEL, F. und G. RÜHRBORN, Springer-Verlag 1970
- ADLER, I.-D., RÜHRBORN, G.: Cytogenetic Investigation
of Meiotic Chromosomes of Male Mice after Chronic
Caffeine Treatment.
Humangenetik 8, 81-85 (1969)
- ALDERSON, T., KHAN, A.H.: Caffeine-induced Mutagenesis
in Drosophila.
Nature Vol. 215, 1080-1081 (1967)
- ALLEN, J.W., LATT, S.A.: Analysis of sister chromatid
exchange formation in vivo in mouse spermatogonia
as a new test system for environmental mutagens.
Nature Vol. 260, 449-451 (1976)
- AMES, B.N., DURSTON, W.E., YAMASAKI, E., LEE, F.D.:
Carcinogens are Mutagens: A simple test system
combining liver homogenates for Activation and
bacteria for detection.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 70, No. 8,
2281-2285 (1973)
- ARAKAKI, D.T., SCHMID, W.: Chemical Mutagenesis
The Chinese hamster bone marrow as an in vivo
test system. II. Correlation with in vitro results
on chinese hamster fibroblasts and human fibro-
blasts and lymphocytes.
Humangenetik 11, 119-131 (1971)
- AXELROD, J., REICHENTHAL, J.: The fate of caffeine
in man and a method for its estimation in
biological material.
J. of Pharm. and Exp. Therapeutics, Baltimore,
107, 519-523 (1953)

BACHMANN, G., HALDI, J., WYNN, W., ENSOR, C.: Reproductivity and growth of albino rats on a prolonged daily intake of caffeine.
Journal of Nutr., Vol. 32, 239-247 (1946)

BASLER, A., BACHMANN, U., ROSZINSKY-KÜCHER, G., RÜHRBORN, G.: Effects of Caffeine on Sister Chromatid Exchanges (SCE) in vivo.
(in press)

BASLER, A., HERBOLD, B.: Mutagenese und Umwelteinflüsse.
Hippokrates 47, 123-141 (1976)

BASLER, A., RÜHRBORN, G.: Chromosome Aberrations in oocytes of NMRI mice and bone marrow cells of chinese hamsters induced with 3,4 benzpyrene.
Mut. Res. 38, 327-332 (1976)

BATES, T.R., GALOWNIA, J., JOHNS, W.H.: Effect of complexation with caffeine on the in vitro transport of drug molecules through an artificial membrane absorption model.
Chem. Pharm. Bull. 18, 656-662 (1970)

BAUER, K.H.: Das Krebsproblem
Einf. in die allg. Geschwulstlehre, 1949

BAUKNECHT, TH., VOGEL, W., BAYER, U., WILD, D.: Comparative in vivo mutagenicity testing by SCE and micronucleus induction in mouse bone marrow.
Hum. Gen. 35, 299-377 (1977)

BAYER, U., BAUKNECHT, T.: The dose dependence of sister chromatid exchanges induced by 3 hydrocarbons, in the in vivo bone marrow test with chinese hamsters.
Experientia 33, 25 (1976)

- BECCHETTI, A., PALITTI, F., KIHLMAN, B.: Studies on the induction of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations by chemical mutagens.
Mut. Res. 38 (2), 103 (1976)
- BENDER, M.A., GRIGGS, H.G., BEDFORD, J.S.: Recombinational DNA repair and sister chromatid exchanges.
Mut. Res. 24, 117-123 (1974)
- BENEDIGKEIT, H.E., HANAWALT, P.C.: Caffeine inhibition of DNA repair replication in *E. coli*.
Bacteriologia Proc., Abstracts of the 68 th Annual Meeting, 36 (1968)
- BLOOM, S.E., HSU, T.C.: Differential fluorescence of sister chromatids in chicken embryos exposed to 5-bromodeoxyuridine.
Chromosoma 51, 261-267 (1975)
- BÜHLKE, G.: Die 3,4-Benzpyren-Elimination in der Rattenlunge vom Staub der Außenluft und anderen Trägerstoffen.
Diss. der Med. Fak. der Univ. Düsseldorf, 1969
- BOLLER, K., SCHMID, W.: Chemische Mutagenese beim Säuger. Das Knochenmark des chin. Hamsters als in vivo Testsystem. Hämatolog. Befunde nach Behandlung mit Trenimon.
Humangenetik 11, 35-54 (1970)
- BORNEFF, J.: Hygiene, ein Leitfaden für Studenten und Ärzte.
2. überarb. und erw. Aufl., Thieme Verlag 1974

- BOVERI, TH.: Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren.
Verlag Gustav Fischer, Jena 1914
- BREDERECK et AL.: Neuere Methoden der präp. organ. Chemie II. 16. Synthesen mit Säure-amiden, insbesondere mit Formamid.
Angew. Chemie 71, 753-774 (1959)
- BUCHER, O.: Cytologie, Histologie und mikroskop. Anatomie des Menschen.
8. neu bearb. Aufl., 1973, H. Huber Verlag
- COMINGS, D.E.: Isolabelling and Chromosome Strandedness.
Nat. New Biology, Vol. 229, 24-25 (1971)
- CZOK, G., SCHMIDT, B., LANG, K.: Vergleichende tierexperimentelle Untersuchungen mit Kaffee und Tee.
Zeitschr. Ernährungswiss. 9, 103-117 (1969)
- DELVAUX, A.-M., DEVORET, R.: The occurrence of suppressors in caffeine-resistant mutants from E. coli K 12
Mut. Res. 7, 273-285 (1969)
- DUTRILLAUX, B., FOSSE, A.M., PRIEUR, M., LEJEUNE, J.: Analyse des échanges de chromatides dans les cellules somatiques humaines.
Chromosoma 48, 327-340 (1974)
- EICHLER, O.: Kaffee und Coffein.
2. völlig neu bearb. Aufl., Springer-Verlag 1976
- EPPLEN, J.T., SIEBERS, J.W., VOGEL, W.: DNA replication patterns of human chromosomes from fibroblasts and amniotic fluid cells revealed by a giemsa staining technique.
Cytogenet. Cell Genet. 15, 177-185 (1975)

- EPSTEIN, S.: The failure of caffeine to induce mutagenic effects or to synergize the effects of known mutagens in mice.
In: Chemical Mutagenesis in Mammals and Man.
F. VOGEL und G. RÜHRBORN, Springer-Verlag 1970
- EPSTEIN, S.S., SHAFNER, H.: Chemical Mutagens in the human environment.
Nature Vol. 219, 385-387 (1968)
- FRIES, N.: The production of mutations by caffeine
Hereditas 36, 134-149 (1950)
- FRIES, N., KIHLMAN, B.: Fungal mutations obtained with methylxanthines.
Nature 162, 573 (1948)
- GEARD, C.R., PEACOCK, W.J.: Sister chromatid exchanges in *Vicia faba*.
Mut. Res. 7, 215-223 (1969)
- HAG AG: Kaffee und Coffein.
Referatedienst der med. Literatur 1970
- HARM, W.: Differential effects of acriflavine and caffeine on various ultraviolet-irradiated *E. coli* strains and T1 phage.
Mut. Res. 4, 93-110 (1967)
- HARM, W.: Analysis of Photoenzymatic Repair of uv-lesions in DNA by single light flashes.
VIII. Inhibition of photoenzymatic repair of uv-lesions in *E. coli* DNA by caffeine.
Mut. Res. 10, 319-333 (1970)

- HARTLEY-ASP, B., KIHLMAN, B.A.: Caffeine, caffeine derivatives and chromosomal aberrations.
II. Synergism between Mitomycin C and caffeine in chinese hamster cells.
Hereditas 69, 326-327 (1971)
- HATCHER, N.H., BRINSON, P.S., HOOK, E.B.: Sister chromatid exchange in Ataxia telangiectasia.
Mut. Res. 35, 333-336 (1976)
- HEDDLE, J.A.: The predicted ratios of single to twin sister chromatid exchanges.
Mut. Res. 6, 57-65 (1968)
- HEIM, F., AMMON, H.P.T.: Coffein und andere Methyl-xanthine.
Schattauer Verlag, 1969
- IKUSHIMA, T., WOLFF, S.: Sister chromatid exchanges induced by light flashes to 5-bromodeoxyuridine and 5-iododeoxyuridine substituted chinese hamster chromosomes.
Exp. Cell Res. 87, 15-19 (1974)
- KATO, H.: Induction of sister chromatid exchanges by uv-light and its inhibition by caffeine.
Exp. Cell Res. 82, 383-390 (1973)
- KATO, H.: Induction of sister chromatid exchanges by chemical mutagens and its possible relevance to DNA repair.
Exp. Cell Res. 85, 239-247 (1974)
- KATO, H., SHIMADA, H.: Sister chromatid exchanges induced by Mitomycin C: a new method of detecting DNA damage at chromosomal level.
Mut. Res. 28, 459-464 (1975)

KIHLMAN, B.: Sister chromatid exchanges in *Vicia faba*.
Chromosoma (Berl.) 51, 11-18 (1975)

KIHLMAN, B., LEVAN, A.: The cytological effect of
caffeine.
Hereditas 35, 109-111 (1949)

KIHLMAN, B., STURELID, S., HARTLEY-ASP, B., NILSSON, K.:
Caffeine potentiation of the chromosome damage
produced in bean root tips and chinese hamster
cells by various chemical and physical agents.
Mut. Res. 17, 271-275 (1973)

KIHLMAN, B., STURELID, S., HARTLEY-ASP, B., NILSSON, K.:
The enhancement by caffeine of the frequencies of
chromosomal aberrations induced in plant and
animal cells by chemical and physical agents.
Mut. Res. 26, 105-122 (1974)

KNORR, M.: Vortrag Zürich, 2. Okt. 1956, in
Schweiz. Z. Hydrol. 19, 283 (1957)

LANG, K.: Alkohol und Coffein
Steinkopff Verlag, Darmstadt 1970

LATT, S.A.: Microfluorometric Detection of Deoxyribo-
nucleic Acid Replication in Human Metaphase
Chromosomes.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 70, No. 12,
Part I, 3395-3399 (1973)

LATT, S.A.: Sister chromatid exchanges, indices of
human chromosome damage and repair: detection
by fluorescence and induction by mitomycin C.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 71, No. 8,
3162-3166 (1974)

MANNHEIMER ANTWORTKATALOG: Ökologie
Mannheimer Autorenkollektiv 1975

- MARIN, G., PRESCOTT, D.M.: The frequency of sister chromatid exchanges following exposure to varying dosis of H3-thymidine or x-rays.
Journal of Cell Biology, Vol. 21, 159-167 (1964)
- McCANN, J., CHOI, E., YAMASAKI, E., AMES, B.N.:
Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 72, No. 12, 5135-5139 (1975)
- McCANN, J., SPINGARN, N.E., KOBORI, J., AMES, B.N.:
Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids.
Proc. Nat. A. S. USA, Vol. 72, No. 3, 979-983 (1975)
- MITTLER, S., MITTLER, J.E., OWENS, S.L.: Loss of chromosomes and nondisjunction induced by caffeine in drosophila.
Nat. Vol. 214, 424 (1967)
- NAGAI, S.: Stabilizing effect of caffeine on respirationally unstable strain of yeast.
Exp. Cell Res. 26, 253-259 (1962)
- OSTERTAG, W.: Koffein- und Theophyllinmutagenese bei Zell- und Leukozytenkulturen des Menschen.
Mut. Res. 2, 249-267 (1966)
- OSTERTAG, W., DUISBERG, E., STORMANN, M.: The mutagenic activity of caffeine in man.
Mut. Res. 2, 293-296 (1965)
- OSTERTAG, W., GREIF, B.: Die Erzeugung von Chromatidenbrüchen durch Coffein in Leukozytenkulturen des Menschen.
Humangenetik 3, 282-294 (1967)

- OSTERTAG, W., HAAKE, J.: The mutagenicity in *Drosophila melanog.* of caffeine and of other compounds which produce chromosome breakage in hum. cells in culture. Z. Vererbungsbl. 98, 299-308 (1966)
- PALITTI, F., BECCHETTI, A.: Effect of Caffeine on sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations induced by mutagens in chin. hamster cells.
Mut. Res. 45, 157-159 (1977)
- PERRY, P., EVANS, H.J.: Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange.
Nature Vol. 258, 121-125 (1975)
- PERRY, P., WOLFF, S.: New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids.
Nature Vol. 251, 156-158 (1974)
- RIEGER, R.: Über Chromosomenmutationen und einige ihrer Beziehungen zum Krebsproblem.
Zeitschr. f. Urol. 56 8/9, 511-524 (1963)
- RÖHRBORN, G.: Über mögliche mutagene Nebenwirkungen von Arzneimitteln beim Menschen.
Humangenetik 1, 205-231 (1965)
- RÖHRBORN, G.: Mutagenitätsuntersuchungen an Mäusen nach chron. Behandlung mit Coffein.
In: Physiolog., pharmakolog. und klin. Wirkung des Kaffees (eds. G. CZOK, K. LANG)
Z. Ernährungsw., Suppl. 14, 54-67 (1972)
- RÖHRBORN, G.: Methods for routine mutagenicity screening in mammals and man.
In: Environmental Quality and Safety, Vol. 4,
Georg Thieme Publishers, Stuttgart 1975

- RÖHRBORN, G., BUCKEL, U.: Investigations on the frequency of chromosome aberrations in bone marrow cells of chinese hamsters after simultaneous application of caffeine and cyclophosphamide. Hum. Gen. 33, 113-119 (1976)
- RÖMPP, H.: Chemie-Lexikon
7. Aufl. 1972
- ROMMELAERE, J., SUSSKIND, M., ERRERA, M.: Chromosome and chromatid exchanges in chinese hamster cells. Chromosoma 41, 243-257 (1973)
- SAVAGE, R.K.: Chromosomal aberrations as tests for mutagenicity.
Nature Vol. 258, 103-104 (1975)
- SCHLEIERMACHER, E., SCHRÖDER, T.M., ADLER, I.D., VROBA, M., VOGEL, F.: Mutationen durch chem. Einwirkungen bei Säuger und Mensch. Cytogenet. Untersuchungen in vivo und in vitro.
Dtsch. med. Wschr. 92, 2343-2350 (1967)
- SCHMID, F.: Neuere Befunde zur Frage Krebs und Ernährung.
Ernährungs-Umschau 16, 172-179 (1969)
- SCHMID, F., FRITZ, W.: Zur Genese des Magenkrebses. II. Die Bedeutung kanzerogener Kohlenwasserstoffe in Nahrungsmitteln.
Mitteilungs d. Ges. zur Bekämpfung d. Krebskrankheiten 5, 15-29 (1968)
- SCHMID, W., ARAKAKI, D.T., BRESLAU, N.A., CULBERTSON, J.: Chemical Mutagenesis. The chinese hamster bone marrow as an in vivo test system. I. Cytogenetic Results on Basic Aspects of the methodology, obtained with alkylating agents.
Humangenetik 11, 103-118 (1971)

- SCHMID, W., STAIGER, G.R.: Chromosome studies on bone marrow from chinese hamsters treated with benzodiazepine tranquillizers and cyclophosphamide. Mut. Res. 7, 99-108 (1969)
- SHABAD, L.M.: Studies in the USSR on the Distribution, Circulation and Fate of Carcinogenic Hydrocarbons. Cancer Res. 27, 1132 (1967)
- SHAFFER, D.A.: Replication Bypass model of sister chromatid exchanges and implications for Bloom's Syndrome and Fanconi's Anemia. Hum. Gen. 39, No. 2, 177-190 (1977)
- SOLOMON, E., BOBROW, M.: Sister chromatid exchanges - a sensitive assay of agents damaging human chromosomes. Mut. Res. 30, 273-277 (1975)
- STETKA, D.G., WOLFF, S.: Sister chromatid exchange as an assay for genetic damage induced by mutagens-carcinogens. II. In vitro test for compounds requiring metabolic activation. Mut. Res. 41, 343-350 (1976)
- STONE, L.E., DEWEY, W.C., MILLER, H.H.: Segregation of DNA and sister chromatid exchanges in chinese hamster chromosomes. Cytobiologie, Vol. 5, No. 3, 324-334 (1972)
- TAKEHISA, S., WOLFF, S.: Induction of sister chromatid exchanges in chinese hamster cells by carcinogenic mutagens requiring metabolic activation. Mut. Res. 45, 263-270 (1977)
- TASCHE, S.: Synergistische Wirkung von Coffein und 3,4-Benz(a)pyren auf das Knochenmark des chin. Hamsters. Diss. der Med. Fak. der Univ. Düsseldorf (im Druck)

- TAYLOR, J.H.: Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes.
Genetics 43, 515-529 (1958)
- TROSKO, J.E., CHU, E.H.Y.: Effects of caffeine on the induction of mutations in chinese hamster cells by UV-light.
Mut. Res. 12, 337-340 (1971)
- TS'O, P., HELMKAMP, G.K., SANDER, C.: Interaction of nucleosides and related compounds with nucleic acids as indicated by the change of helic-coil transition temperature.
Proc. Nat. A. S. USA, 48, 686-697 (1962)
- TS'O, P., LU, P.: Physical binding of thymidine, adenine, caffeine, steroids and phenanthrene to DNA and poly-A.
Federation Proc. 22, 583 (1963)
- ULRICH, P.: Coffee and caffeine. Bristol 1958
Zit. nach: PETERS, J.M.: Factors affecting caffeine toxicity (a review of the literature).
J. clin. Pharmacol. 7, 131-141 (1967)
- ULRICH, R.: Der Kaffee und das Coffein.
Thieme Verlag 1953
- VOGEL, F., KRÜGER, J., KURTH, M., SCHRÖDER, T.M.:
Über das Fehlen einer Beziehung zwischen dem Kaffeegegnuß der Eltern und dem Geschlechtsverhältnis unter ihren Kindern.
Humangenetik 2, 119-132 (1966)

VOGEL, F., KRÜGER, J., RÖHRBORN, G., SCHLEIERMACHER, E.,
SCHRÖDER, T.M.: Mutationen durch chem. Einwirkungen
bei Säuger und Mensch. Statistische Untersuchungen
beim Menschen und zusammenfassende Betrachtungen.
Dtsch. med. Wschr. 92, 2382-2388 (1967)

VOGEL, F., RÖHRBORN, G.: Mutationen durch chem.
Einwirkungen bei Säuger und Mensch. Gen. Unter-
suchungen an der Maus.
Dtsch. med. Wschr. 92, 2315-2321 (1967)

VOGEL, F., RÖHRBORN, G., SCHLEIERMACHER, E.,
SCHRÖDER, T.M.: Mutationen durch chem. Einwirkungen
bei Säuger und Mensch. Das Problem und ein
Forschungsprogramm zu seiner Bearbeitung.
Dtsch. med. Wschr. 92, 2249-2254 (1967)

VOGEL, W., BAUKNECHT, TH.: Differential chromatid
staining by in vivo treatment as a mutagenicity
test system.
Nature Vol. 260, 448-449 (1976)

VOGEL, W. BAUKNECHT, TH.: Effects of Caffeine on
Sister Chromatid Exchange (SCE) after Exposure
to UV light or Triaziquone. Studied with a
Fluorescence Plus Giemsa (FPG) Technique.
Hum. Gen. 40, 193-198 (1978)

WOLFF, S.: Are sister chromatid exchanges sister
strand crossovers or radiation-induced exchanges?
Mut. Res. 1, 337-343 (1964)

WOLFF, S., BODYCOTE, J., PAINTER, R.B.: Sister chromatid
exchanges induced in chinese hamster cells by
UV-irradiation of different stages of the cell cycle:
the necessity for cells to pass through S.
Mut. Res. 25, 73-81 (1974)

- WOLFF, S., PERRY, P.: Differential giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchange without autoradiography. Chromosoma 48, 341-353 (1974)
- ZABEZHINSKY, M.A.: Role of autotransport in air pollution by carcinogenic hydrocarbon-benz(a)pyrene.
Dissertation Moskau, 1966
(zitiert in: SHABAD, L.M., 1967)
- ZAKHAROV, A.F., EGOLINA, N.A.: Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. I. BUDR-revealed differentiation in chinese hamster chromosomes.
Chromosoma 38, 341-365 (1972)
- ZETTERBERG, G.: The mutagenic effect of 8-ethoxy-caffein, caffein and dimethylsulfate in the ophiostoma back-mutation test.
Hereditas 46, 279-311 (1960)

Herrn Prof. Dr. G. RÖHRBORN danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der Versuchstiere und der technischen Einrichtungen. Auch für die wertvollen Anregungen und Ratschläge, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen, möchte ich ihm herzlich danken.

Herrn Dr. A. BASLER danke ich für seine Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft.

Lebenslauf

Am 18. August 1954 wurde ich in Langenfeld,
Kreis Mettmann, geboren.

Von 1961 bis 1965 besuchte ich die Volksschule
in Langenfeld. Aus der vierten Grundschulklasse
ging ich zur Realschule über. 1970 erhielt ich
das Abschlußzeugnis der Realschule.

Anschließend war ich drei Jahre Schülerin
des Landrat-Lucas I-Gymnasiums in Opladen.

Im Mai 1973 bestand ich an dieser Schule die
Reifeprüfung. Seit dem Wintersemester 1973/74
studiere ich an der Universität Düsseldorf
Humanmedizin.

